



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**"EVALUACIÓN DE LA EMBRIOTOXICIDAD Y
TERATOGENICIDAD INDUCIDA POR AMOXICILINA
SOBRE *Danio rerio*"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICAS**

PRESENTA

M. en C.Q. EDGAR DAVID GONZÁLEZ GONZÁLEZ

DIRIGIDO POR

DR. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN

DRA. HARIZ ISLAS FLORES

DRA. MARCELA GALAR MARTÍNEZ



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

ABRIL 2021

El presente trabajo fue posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y desarrollado en el Laboratorio de Toxicología Ambiental de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx)

DEDICADO A:

Dios

por sostenerme y amarme

Mi madre

por su amor y fortaleza

Mi hermano

por ser mi cómplice y amigo

Mi familia

por su confianza y apoyo

AGRADECIMIENTOS

El Señor es mi fuerza y mi escudo; mi corazón en él confía; de él recibo ayuda. Mi corazón salta de alegría, y con cánticos le daré gracias. Salmos 28:7 (NVI)

Deseo mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas sin las cuales este trabajo no habría sido posible:

A mi director de tesis, Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván por darme la oportunidad de recurrir a su experiencia científica, por la paciencia y confianza para el logro de este proyecto de investigación.

A mi madre por su fuerza, amor y comprensión. Gracias por estar siempre a mi lado. La fuerza de una madre es más grande que las leyes de la naturaleza (Barbara Kingsolver). ¡Te amo y admiro mamá!

A mi hermano por animarme a conseguir mis metas. ¡Te quiero!

A mis tíos (Anita, Raque, Irma, José Luis, Lety, Joel y Catalina) y primos (Ivonne, Arturo, Arlette, Edwin y Vanessa) por el cariño y confianza que me brindan en todo momento.

A mis médicos (Dr. Catarino García Díaz, Dr. Iván Sergei Pérez Rogel, Dr. Mauricio Castillo Barradas y Dr. Enrique Wolpert Barraza) por todo lo que han hecho por mi salud.

A mis exalumnos Gina y Neri por acompañarme y apoyarme en esta etapa de mi vida.

Todos nuestros sueños se pueden hacer realidad si tenemos el coraje de perseguirlos (Walt Disney)

ÍNDICE

Contenido	Página
RELACIÓN DE TABLAS	1
RELACIÓN DE FIGURAS	2
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	6
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo general	
4.2. Objetivos específicos	
5. METODOLOGÍA	21
5.1. Mantenimiento de los organismos reproductores	
5.2. Obtención de los ovocitos	
5.3. Evaluación del desarrollo embrionario producido por amoxicilina sobre <i>Danio rerio</i>	
5.4. Evaluación del potencial teratogénico producido por amoxicilina sobre <i>Danio rerio</i>	
5.5. Evaluación del estrés oxidativo (oxidación celular y actividad antioxidante) inducido por amoxicilina sobre embriones de pez cebra	
5.5.1. Determinación del grado de lipoperoxidación	

5.5.2. Determinación del contenido de hidroperóxidos	
5.5.3. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa	
5.5.4. Determinación de la actividad de la catalasa	
5.5.5. Determinación del contenido de proteínas	
6. RESULTADOS	28
6.1. Embrioletalidad y teratogenicidad producidas por amoxicilina sobre <i>Danio rerio</i>	
6.2. Malformaciones producidas por amoxicilina en embriones de <i>Danio rerio</i>	
6.3. Estrés oxidativo inducido por amoxicilina sobre embriones de pez cebra	
7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIONES	43
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
10. ANEXOS	61

RELACIÓN DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la amoxicilina	9
Tabla 2. Curva patrón para la determinación de proteínas	27
Tabla 3. Datos de mortalidad y malformaciones en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a amoxicilina	28
Tabla 4. Principales malformaciones identificadas en embriones de pez cebra por exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de amoxicilina ...	33

RELACIÓN DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos	9
Figura 2. Taxonomía y principales etapas del desarrollo embrionario del pez cebra	13
Figura 3. Stock de reproductores de pez cebra	21
Figura 4. Tanque de reproducción y desove para pez cebra	22
Figura 5. Evaluación teratogénica y embriotóxica de la amoxicilina en pez cebra	23
Figura 6. Sistema de puntuación de morfología general	24
Figura 7. Evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo inducido por amoxicilina en pez cebra	25
Figura 8. Mortalidad de los embriones de pez cebra expuestos a amoxicilina ...	29
Figura 9. Tasa de supervivencia y malformación de embriones de pez cebra expuestos a amoxicilina	30
Figura 10. Efectos en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a diferentes concentraciones de amoxicilina	31
Figura 11. Curvas concentración-respuesta de amoxicilina en embriones de <i>Danio rerio</i>	32

Figura 12. Malformaciones producidas en embriones de <i>Danio rerio</i> por exposición a amoxicilina	33
Figura 13. Biomarcadores de oxidación celular en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a amoxicilina	36
Figura 14. Actividad de las enzimas antioxidantes en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a amoxicilina	37

RESUMEN

La amoxicilina (AMX) es un antibiótico que ha sido incluido recientemente en la lista de sustancias prioritarias como compuesto objetivo para monitorear su riesgo para el medio acuático. Estudios previos han demostrado que este antibiótico genera efectos tóxicos, entre los que destaca el estrés oxidativo en organismos acuáticos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto sobre el desarrollo embrionario y los efectos teratogénicos inducidos por la AMX a concentraciones ambientalmente relevantes en ovocitos y embriones de *Danio rerio*. Además, se evaluaron los biomarcadores de estrés oxidativo a las 72 y 96 hpf. La CL_{50} fue de $14.192 \mu\text{gL}^{-1}$, la CE_{50m} fue de $7.083 \mu\text{gL}^{-1}$ y el IT fue de 2.003. Los biomarcadores de oxidación celular y las enzimas antioxidantes se modificaron de forma dependiente de la concentración, con respecto al grupo control ($p < 0.05$). Las principales malformaciones identificadas fueron malformación de la cola, edema pericárdico, malformación del saco vitelino, escoliosis, ausencia de la aleta pectoral y retardo en la eclosión. Los resultados permiten concluir que la AMX en concentraciones ambientalmente relevantes es capaz de inducir efectos embriotóxicos, teratogénicos y daño oxidativo. Este compuesto representa un riesgo para organismos acuáticos como *Danio rerio*.

ABSTRACT

Amoxicillin (AMX) is an antibiotic that has only recently been included in the European Union Watch List as a target compound to monitor its risk to the aquatic environment. Previous studies have shown that this antibiotic generates toxic effects, including oxidative stress in aquatic organisms. The aim of this study was to evaluate the effect on embryonic development and the teratogenic effects induced by AMX at environmentally relevant concentrations *Danio rerio* oocytes and embryos. In addition, oxidative stress biomarkers were evaluated at 72 and 96 hpf. The LC_{50} was $14.192 \mu\text{gL}^{-1}$, EC_{50m} was $7.083 \mu\text{gL}^{-1}$ and TI was 2.003. Biomarkers of cellular oxidation and antioxidant enzymes were concentration-dependently modified, with respect to the control group ($p < 0.05$). The main malformations identified were tail malformation, pericardial edema, yolk sac malformation, scoliosis, absence of the pectoral fin and delayed hatching. The results lead to the conclusion that AMX at environmentally relevant concentrations is capable of inducing embryotoxic and teratogenic effects and oxidative damage. This compound represents a risk for aquatic organisms such as *Danio rerio*.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los productos farmacéuticos son compuestos químicos complejos que se utilizan ampliamente en todo el mundo. Actualmente, existen miles de principios activos que se usan para combatir o prevenir enfermedades, y cada año se sintetizan cientos de nuevos productos para reemplazar otros ya obsoletos (Zuccato et al., 2005).

En 1976, se realizó el primer estudio sobre la contaminación por fármacos en una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de Kansas City. Los resultados fueron ignorados durante 15 años después de su publicación (Hignite y Azarnoff, 1977). En 1992, investigadores alemanes encontraron ácido clofíbrico mientras buscaban herbicidas en el agua (Heberer y Stan, 1997). En ese mismo año, estudios en Alemania y Suiza reportaron la presencia de este compuesto en ríos y lagos. A partir de los resultados de estos trabajos europeo, algunos investigadores norteamericanos comenzaron a prestar atención al problema de los medicamentos en el medio ambiente (Raloff, 1998).

En los últimos 15 años, diferentes reportes han demostrado que los fármacos representan una nueva clase de contaminantes del ambiente acuático, ocasionando daños a la salud sobre los organismos que ahí habitan (hidrobiontes) e incluso al ser humano, es por ello por lo que actualmente estos productos representan un problema ambiental a nivel mundial y han sido llamados contaminantes emergentes.

Los medicamentos han sido encontrados en aguas superficiales (lóticas y lénticas) y subterráneas (freáticas) e incluso en el agua potable (Montague, 1998). La contaminación proviene no solo de las excreciones, con las que un porcentaje importante del fármaco es eliminado del cuerpo sin metabolizarse, sino que procede también de la producción, tratamiento y disposición inadecuada de los desechos de estos productos (Breton y Boxall, 2003).

Los medicamentos están diseñados para tener vías y acciones específicas en humanos y animales, pero también tienen efectos secundarios indeseables. Una vez que estos productos ingresan al medio ambiente, pueden afectar a animales con órganos, tejidos, células o biomoléculas similares (Fent et al., 2006).

Los antibióticos son un grupo amplio y heterogéneo de fármacos ampliamente utilizados alrededor del mundo, tanto en humanos como en animales. Según un estudio reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el consumo total de antibióticos osciló entre 4.4 y 64.4 dosis diarias definidas (DDD) por 1000 habitantes/día. En la mayoría de los países, la amoxicilina (AMX) y la amoxicilina/ácido clavulánico fueron los antibióticos consumidos con mayor frecuencia (OMS, 2018). Diversos estudios han reportado la presencia de antibióticos no sólo en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs), sino también en aguas superficiales y subterráneas (Ji et al., 2012).

Los antibióticos son descargados al medio ambiente acuático a través de efluentes municipales; plantas de fabricación, hospitales y efluentes de PTARs; eliminación de compuestos no utilizados o caducados por el desagüe; escorrentía superficial de los campos, donde los animales han sido tratados con antibióticos; dosificación directa de antibióticos en el agua para la acuicultura, etc. El traslado de antibióticos de diversas fuentes a los seres humanos, los animales y el ambiente implica un ciclo de biotransformación parcial, bioacumulación y depósito gradual de estos agentes en el suelo y las aguas subterráneas (Manzetti y Ghisi, 2014).

La contaminación acuática es principal forma de contaminación porque la mayoría de los contaminantes químicos se liberan en el océano, ríos, lagos y humedales. En los últimos años, se han detectado antibióticos en concentraciones de μgL^{-1} en aguas residuales municipales, efluentes de PTARs y en aguas superficiales y subterráneas (Kümmerer, 2003; Watkinson et al., 2009; Zheng et al., 2012; Gibs et al., 2013; Johnson et al., 2015).

La presencia de estos compuestos farmacéuticos en sistemas de agua dulce ha atraído cada vez más atención porque representan una amenaza potencial para el medio ambiente. Los antibióticos suponen un riesgo para los ecosistemas, incluso a bajas concentraciones, ya que están diseñados para tener un efecto bioquímico sobre los organismos (Huerta et al., 2013; Neri-Cruz et al., 2017). En consecuencia, los antibióticos han sido considerados contaminantes emergentes en los ecosistemas acuáticos, lo que requiere de un examen minucioso del campo de las ciencias ambientales (Manzetti y Ghisi, 2014).

Entre los antibióticos, la amoxicilina (AMX) se consume ampliamente en todo el mundo; representa aproximadamente el 29.4% del total de las DDD en la región de las Américas (OMS, 2018). Es un antibiótico β -lactámico (que pertenece al grupo de las penicilinas) ampliamente recetado en medicina veterinaria y humana para prevenir y tratar infecciones bacterianas (respiratorias, urinarias y de la piel).

Los antibióticos β -lactámicos son agentes bactericidas que actúan principalmente a través de 2 mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana. La etapa final de la síntesis de la pared bacteriana implica la formación de tetrapéptidos a partir de pentapéptidos (mediante la pérdida de uno de los aminoácidos terminales), para lo que se necesita la acción de las enzimas localizadas en el espacio periplásmico, llamadas de forma genérica transpeptidasas. El anillo β -lactámico es estructuralmente similar a la región del pentapéptido al que se unen estas enzimas, por lo que puede unirse covalentemente a ellas y así impedir la formación de la pared celular (Figura 1) (Suárez y Gudiol, 2009).

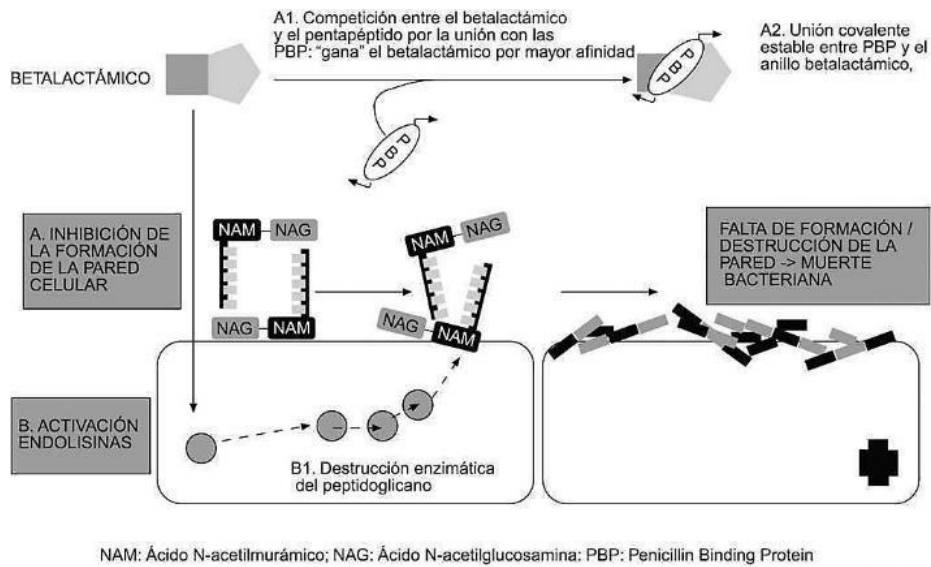
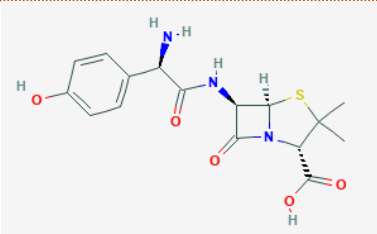


Figura 1. Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos (Suárez y Gudiol, 2009)

Algunas de las propiedades físicas y químicas de la AMX se muestran en la siguiente tabla (Brain et al., 2004; Park y Choi, 2008; Kümmerer, 2009):

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la amoxicilina

Fórmula química	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$
Estructura química	
Peso molecular ($g\text{mol}^{-1}$)	365.4
pKa₁	2.8
pKa₂	7.2
log Kow	0.87
Solubilidad en agua	4000 mgL^{-1}

A través de la extrapolación de su uso en el sector veterinario, se sabe que los antibióticos, como la AMX, se adicionan a los alimentos para promover el crecimiento de animales. La

AMX y la ampicilina fueron los dos agentes antimicrobianos más frecuentemente utilizados en 71 países entre 2000 y 2010 (Van Boeckel et al., 2014). La AMX es uno de los dos antibióticos más comúnmente recetados en China (Zhang et al., 2013) y el más prescrito en Brasil entre 2007 y 2011, con más de 6 mil millones de unidades vendidas (De Magalhães y Borschiver, 2012).

Después de su administración, la AMX pasa a través del cuerpo humano sin cambios, se excreta y entra en las aguas residuales. La eliminación incompleta de la AMX excretada e inalterada durante el tratamiento de aguas residuales contribuye a su presencia ambiental. Por lo tanto, el uso inadecuado de este antibiótico puede resultar en su presencia en cuerpos acuáticos, así como en la aparición de residuos indeseables en tejidos animales. Estos residuos son un peligro para la salud humana, causando reacciones alérgicas en algunos individuos y, lo más importante, la reducción de la eficacia de los antibióticos como resultado de la aparición de cepas resistentes al tratamiento con antibióticos.

La AMX se ha detectado en cuerpos de agua en concentraciones en el rango de μgL^{-1} . Se ha reportado la presencia de este compuesto en aguas residuales sin tratar en concentraciones de 6.94, 0.28 y 11.990 $\mu\text{g/L}^{-1}$ (Watkinson et al., 2007; Kaseva et al., 2008; Watkinson et al., 2009; Ebele et al., 2017); en el efluente de una PTAR en concentraciones de 0.0018 a 0.12 μgL^{-1} (Andreozzi et al., 2004; Castiglioni et al., 2005), 0.622 μgL^{-1} (Zuccato et al., 2010), 0.05 μgL^{-1} (Watkinson et al., 2009) y 0.03 μgL^{-1} (Watkinson et al., 2007); en efluentes hospitalarios y aguas residuales urbanas en concentraciones de 0.9 y 1.67 μgL^{-1} , respectivamente (Fatta-Kassinos et al., 2011); y en aguas superficiales en concentraciones de 0.039 a 0.245 μgL^{-1} (Kasprzyk-Hordern et al., 2007) y 0.2 μgL^{-1} (Watkinson et al., 2009; Fatta-Kassinos et al., 2011). Se ha señalado que las concentraciones traza de contaminantes emergentes, como la AMX, pueden inducir efectos bioquímicos y alterar el desarrollo en los peces, lo que afecta su salud y su capacidad para responder a los cambios ambientales (Halling-Sørensen, 2000; Park y Choi, 2008).

Varios estudios han descrito los efectos tóxicos de las concentraciones traza de AMX en los organismos acuáticos. Andreozzi et al. (2004) describieron la alta toxicidad inducida por AMX a las 96 h en la cianobacteria *Synechococcus leopoliensis* expuesta a concentraciones que oscilaban entre 50 ngL⁻¹ y 50 mgL⁻¹. En el pez cebra (*Danio rerio*), Oliveira et al. (2013) encontraron eclosión prematura de embriones, malformaciones como edema y deformidades de la cola y cambios en la actividad enzimática en embriones y adultos con exposición a corto plazo a AMX en concentraciones que van de 10 a 900 mgL⁻¹, mientras que Liu et al. (2015) describieron la toxicidad inducida por AMX en el alga verde-azul *Microcystis aeruginosa* por exposición a corto plazo a 200-500 ngL⁻¹ de este antibiótico.

Elizalde-Velázquez et al. (2017) evaluaron el estrés oxidativo (EOx) inducido por AMX en cerebro, branquias, hígado y riñón de *Cyprinus carpio*. La carpa se expuso durante 12, 24, 48, 72 y 96 h a dos concentraciones diferentes de AMX (10 ngL⁻¹ y 10 µgL⁻¹) y se midieron los siguientes biomarcadores: grado de lipoperoxidación (LPX), contenido de hidroperóxidos (HPX), contenido de proteínas carboniladas (CPC) y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX). Los resultados mostraron incrementos significativos en el grado de LPX, el contenido de HPX y el CPC en todos los órganos del estudio, particularmente en riñón, así como cambios significativos en la actividad de las enzimas antioxidantes.

Recientemente, Orozco-Hernández et al. (2019) determinaron las alteraciones genotóxicas (ensayo cometa y prueba de micronúcleos) y citotóxicas (actividad de caspasa-3 y ensayo TUNEL) producidos por AMX a concentraciones ambientalmente relevantes (0.0039 µgL⁻¹ y 1.67 µgL⁻¹) en *Cyprinus carpio*. Los resultados mostraron que las concentraciones ambientalmente relevantes de AMX fueron capaces de generar daños en el ADN y efectos citotóxicos en las células sanguíneas de la carpa común.

Los biomarcadores son indicadores medibles internos de los cambios en los organismos a nivel molecular o celular, ofreciendo la posibilidad de comprender las enfermedades

mediadas por el medio ambiente y mejorar la evaluación del riesgo (Valavanidis et al., 2006). El EOx es un importante mecanismo de acción de los tóxicos y uno de los biomarcadores más utilizados, ya que puede evaluar el daño general a las biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN (Barata et al., 2005). El daño oxidativo a los lípidos, las proteínas y el ADN tiene efectos adversos sobre los mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos en organismos aeróbicos y ha sido utilizado en los últimos años como biomarcador para monitorear la contaminación ambiental (Valavanidis et al., 2006). Los principales biomarcadores de EOx utilizados en los estudios toxicológicos de los sistemas acuáticos son la LPX, el contenido de HPX, la oxidación de proteínas y las defensas antioxidantes enzimáticas (Dröge, 2002).

Los bioindicadores son organismos o comunidades cuyas reacciones observadas, de forma representativa, permiten evaluar una situación, dando pistas sobre la condición de un ecosistema (Gerhardt, 2002; van der Oost et al., 2003). Los peces se consideran buenos bioindicadores de la calidad ambiental y de la contaminación del agua, ya que interactúan extensamente tanto con el agua, como con los sedimentos, y ocupan diferentes hábitats y niveles tróficos (De la Lanza-Espino et al., 2000).

El pez cebra (Figura 2) es un pez tropical de agua dulce, miembro de la familia de los ciprínidos. Fue introducido como modelo animal en la década de 1970 por George Streisinger, quien realizó el primer ensayo en vertebrados que permitió generar avances genéticos, iniciando así una serie de investigaciones sobre el desarrollo embrionario. Los resultados de estos estudios han llevado a la caracterización de un gran número de genes implicados en las etapas del desarrollo de vertebrados, lo que lo estableció como un modelo relevante para enfermedades humanas e investigación farmacéutica (Hill et al., 2005; Barros et al., 2008; Chen et al., 2010). Este ciprínido se ha convertido en un organismo modelo ampliamente utilizado en estudios ecotoxicológicos (Hill et al., 2005). Las ventajas que presenta el pez cebra en la evaluación de cualquier tipo de sustancia son: a) desarrollo embrionario externo, b) embriones y las larvas transparentes (facilitando la

observación de su desarrollo y órganos), c) tiempo corto de desarrollo (72 h), d) gran capacidad reproductiva, y e) amplio conocimiento sobre su biología, además de que su genoma está totalmente secuenciado (Moreno-Fernández, 2013). El pez cebrá se usa ampliamente como modelo para comprender la biología del desarrollo de los vertebrados, además, de presentar una alta conservación en la función de genes entre éste y el ser humano (Clark y Ekker, 2015).




Taxonomía	<i>Danio rerio</i> (Hamilton-Buchanan, 1882)	
Filo: Chordata Clase: Actinopterygii Orden: Cypriniformes	 adulto	
Familia: Cyprinidae Género: <i>Danio</i> Especie: <i>D. rerio</i>	 embrión	 larva

Figura 2. Taxonomía y principales etapas del desarrollo embrionario del pez cebrá

La revisión de la literatura disponible indica que muchos fármacos aumentan el EOx en organismos acuáticos, y tal estrés puede estar relacionado con alteraciones del desarrollo, incluyendo efectos reproductivos, embriotoxicidad y/o teratogenicidad.

La toxicidad para el desarrollo se refiere a los efectos adversos producidos por un xenobiótico sobre el organismo en crecimiento desde el estado embrionario hasta el momento de la maduración sexual de un individuo, este tipo de toxicidad se puede evaluar en dos periodos: 1) la embriotoxicidad, que se refiere a los efectos tóxicos en la progenie entre la concepción y la etapa fetal, mientras que 2) la teratogenicidad, son las malformaciones estructurales o defectos en la descendencia después del periodo de embriogénesis (Sogorb et al., 2014).

Cualquier factor externo que afecte la proliferación, diferenciación celular o apoptosis puede producir efectos embriotóxicos o teratogénicos, estos efectos pueden resultar en malformaciones congénitas permanentes, anormalidades funcionales o incluso en la muerte del embrión. Los factores externos incluyen radiación UV, cambios en el pH, condiciones térmicas, así como sustancias químicas (como los productos farmacéuticos), retinoides, compuestos aromáticos y plaguicidas (Blaustein y Johnson, 2003; Ankley et al., 2004; Hayes et al., 2006).

A pesar de la intensa investigación, los mecanismos implicados en la teratogénesis aún no se comprenden lo suficientemente, sin embargo, se conocen los siguientes mecanismos mediante los cuales los xenobióticos pueden inducir efectos en el desarrollo, e incluyen alteraciones en el ADN, inhibición de enzimas específicas, alteraciones de la membrana, modulación del suministro de energía celular, así como interrupción de la señalización del ácido retinoico o el EOX (Beckman y Brent, 1984; Wells et al., 2005). Muy a menudo, un conjunto complejo de factores y/o la acumulación de errores producen malformaciones morfológicas o letalidad del embrión (Meteyer, 2000).

El oxígeno desempeña un papel clave en el metabolismo y es fundamental para las primeras etapas de desarrollo de los organismos. Se sabe que las especies reactivas de oxígeno (EROs) tienen funciones de señalización y pueden afectar varios procesos fisiológicos y patológicos en un organismo (de Lamirande y Gagnon, 1995; Covarrubias et al., 2008). En la embriogénesis, la regulación de la formación de EROs se ha relacionado con el control de la escisión de los ovocitos (Allen y Balin, 1989), así como con la maduración de los ovocitos, la esteroidogénesis ovárica, la ovulación, la implantación y la formación de blastocistos (Guérin et al., 2001).

Sin embargo, los niveles de EROs deben controlarse continuamente para evitar que se vuelvan altamente tóxicos para las macromoléculas biológicas (proteínas, ADN y lípidos de membrana) (Agarwal et al., 2003). Por lo tanto, el potencial teratogénico de los

xenobióticos depende de las vías embrioprotectoras y de la desintoxicación y reparación de macromoléculas (Wells et al., 2005). Recientemente se demostró que las defensas antioxidantes generales desempeñan un papel importante en la protección tanto de las etapas larvianas tempranas (Tilton et al., 2008; Maria et al., 2009), como de las fases posteriores del desarrollo, así como en el proceso de metamorfosis (Dandapat et al., 2003).

Para proteger contra las EROs, las células contienen antioxidantes no enzimáticos (como el glutatión, la vitamina E y las metalotioneínas) y enzimas que intervienen en la detoxificación de EROs. Estas enzimas incluyen: la SOD que dismuta el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2), la CAT que cataliza la eliminación del H_2O_2 , y la GPX que cataliza la reducción del H_2O_2 o lipoperóxido (Wang et al., 2002). Otras enzimas importantes que son conocidas por proteger el embrión contra las moléculas reactivas son la glutatión-S-transferasa (GST) (Anguiano et al., 2001) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) (Wells et al., 1997).

Los antioxidantes desempeñan una función importante en la protección de las fases larvianas tempranas frente a los efectos de los niveles de oxígeno en el agua (Arun y Subramanian, 1998). Dandapat et al. (2003) mostraron que el contenido de GPX aumentó durante la progresión metamórfica de las larvas del langostino gigante *Macrobrachium rosenbergii*. También se observó un aumento similar en el desarrollo del camarón hierba *Palaemonetes pugio* (Winston et al., 2004), así como en los embriones del sapo común *Bufo arenarum* (Anguiano et al., 2001). En la trucha arcoíris *Salmo iridaeus* se observó alta actividad de la enzima CAT durante el desarrollo temprano (en contraste con niveles relativamente más bajos de la GPX), documentando así el papel primordial de la CAT sobre la GPX en la eliminación del peróxido de hidrógeno (Aceto et al., 1994). Asimismo, se observó un aumento gradual en la actividad de la CAT y GPX durante el crecimiento progresivo del pez dentón común *Dentex dentex* de huevo a larva (Mourente et al., 1999). Por otra parte, en el mismo estudio, Mourente et al. (1999) demostraron que otras dos enzimas de detoxificación (GST y SOD) alcanzaron sus niveles más altos en huevos, en

comparación con etapas posteriores de desarrollo. También se observó un incremento progresivo de la actividad de las enzimas antioxidantes durante la embriogénesis, seguido por un aumento repentino en las larvas del langostino de agua dulce *Macrobrachium malcolmsonii* (Arun y Subramanian, 1998).

La investigación referente a la embriotoxicidad que resulta del EOx ha incluido estudios con compuestos modelo como el H₂O₂ y ha empleado roedores de laboratorio o embriones humanos. En estos estudios, los prooxidantes indujeron daño severo por EOx a los ovocitos, alteraciones mitocondriales, agotamiento del ATP, daño al ADN y peroxidación de lípidos, apoptosis o retraso en el desarrollo del embrión (Nasr-Esfahani et al., 1990; Ozolins y Hales, 1999; Aitken y Krausz, 2001). La importancia del EOx al causar embriotoxicidad o teratogenicidad también se confirmó indirectamente en estudios con mamíferos y humanos, en los que las adiciones externas de antioxidantes evitaron el daño a los embriones (Fraga et al., 1991; Feugang et al., 2004).

Similar a lo que ocurre en los mamíferos, los estudios con prooxidantes modelo también han demostrado efectos perjudiciales en embriones y larvas de peces (Von Westernhagen, 1988; Dietrich et al., 2005; Regoli et al., 2005), así como en las larvas del langostino gigante *Macrobrachium rosenbergii* (Dandapat et al., 2013). Además, la adición de antioxidantes protegió a los peces contra los efectos del EOx, así como su desarrollo embrionario (Toyokuni y Sagripanti, 1992; Ciereszko et al., 1999; Tilton et al., 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

Los grupos terapéuticos de mayor consumo en el mundo han sido los medicamentos utilizados para el dolor y la inflamación como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), los antibióticos, los antihipertensivos (en particular los β -bloqueadores y bloqueadores de los canales del calcio) y los anticonceptivos (esteroides).

Los fármacos que llegan a los ecosistemas acuáticos provienen principalmente de las aguas residuales municipales, hospitalarias y de producción, tratadas o no. Se conoce que algunos medicamentos pueden producir EROs.

Es por ello por lo que, la evaluación ecotoxicológica de los productos farmacéuticos en el ambiente acuático se ha convertido en un área de investigación emergente a nivel mundial.

Los estudios ecotoxicológicos de los medicamentos son frecuentes en la literatura científica. Se han observado efectos nocivos reproductivos, fallo renal y/o hepático, muerte, resistencia y desórdenes endócrinos en varios grupos terapéuticos entre los que se encuentran citotóxicos, antibióticos, anticonceptivos hormonales, AINEs (principalmente diclofenaco) y antidepresivos.

Los datos aportados anteriormente muestran que los estudios sobre la presencia de compuestos farmacéuticos en el ecosistema acuático es un problema de indiscutible actualidad, la mayor parte de estas investigaciones provienen de países desarrollados porque cuentan con los recursos necesarios para enfrentar este problema, pero no hay duda de que la contaminación también existe en los países en desarrollo.

El pez cebra se ha convertido en un organismo modelo ampliamente utilizado en la investigación ecotoxicológica. El impacto de los contaminantes que emergen de las diferentes fuentes de exposición puede generar toxicidad en este tipo de organismos que

constituyen un eslabón importante en la cadena trófica, por lo que si hay presencia de contaminantes como fármacos (antibióticos) en el agua, pueden producir un daño general en el organismo, que puede ser evaluado a través de un biomarcador inespecífico como el estrés oxidativo y bioensayos de toxicidad (embriotoxicidad y/o teratogenicidad).

3. HIPÓTESIS

Los antibióticos son capaces de inducir estrés oxidativo en organismos acuáticos, por lo tanto, es posible que al exponer embriones de *Danio rerio* a amoxicilina haya alteraciones del desarrollo, como embriotoxicidad y/o teratogenicidad.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la embriotoxicidad, teratogenicidad y estrés oxidativo inducidos por amoxicilina sobre embriones de pez cebra (*Danio rerio*)

4.2. Objetivos específicos

- ☒ Evaluar el daño al desarrollo embrionario y el potencial teratogénico producidos por concentraciones ambientalmente relevantes de amoxicilina sobre *D. rerio*

- ☒ Evaluar el estrés oxidativo inducido por la amoxicilina sobre embriones de pez cebra, mediante los siguientes biomarcadores: grado de lipoperoxidación, contenido de hidroperóxidos, actividad de la superóxido dismutasa y catalasa.

5. METODOLOGÍA

5.1. Mantenimiento de los organismos reproductores

Los peces cebra (*Danio rerio*) adultos se obtuvieron comercialmente. Los organismos reproductores deben estar libres de enfermedades visibles externamente y no ser tratados con ningún tratamiento farmacéutico (agudo o profiláctico) antes del desove. Las hembras y los machos se mantuvieron por separado en peceras de vidrio (de 40 L) con agua potable adecuada con $\geq 60\%$ de saturación de oxígeno, suficiente espacio para nadar (es decir, ≥ 1 L por pez) a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperiodos de luz/oscuridad natural (Figura 3). Fueron alimentados con alimento completo en forma de escamas (TetraMin™) hasta una semana antes del desove, cuando este alimento se cambió a nauplios de *Artemia* sp.



Figura 3. Stock de reproductores de pez ceбра

5.2. Obtención de los ovocitos

El día anterior a la prueba, los machos y las hembras (en una proporción 1:2) se colocaron en cámaras de reproducción (Figura 4) que contenían 10 L de agua potable con sal marina (1 mL por L de Instant Ocean) y anticloro, mantenidos a $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Los peces se dejaron durante la noche y los ovocitos se pudieron recolectar a la mañana siguiente. Una vez obtenidos, se observaron a 4X en un microscopio estereoscópico y se separaron los ovocitos viables. Solo se utilizaron los fecundados, no coagulados, en estado de blástula.



Figura 4. Tanque de reproducción y desove para pez cebra

5.3. Evaluación del desarrollo embrionario producido por amoxicilina sobre *D. rerio*

Para evaluar las alteraciones del desarrollo embrionario y los efectos teratogénicos de la AMX, se siguieron las pautas establecidas por la OCDE en su guía de prueba No. 236: toxicidad aguda en embriones de peces (FET), 2013. Se colocaron aleatoriamente 30 embriones (por triplicado) en 2 mL de muestras de agua con AMX a concentraciones ambientalmente relevantes (0.039, 1.746, 3.453, 5.160, 6.868, 8.575, 10.282 y 11.990 μgL^{-1}) y en un sistema de control, libre de fármaco. La exposición se realizó en placas de 24 pozos. El medio no se cambió durante el experimento. Los embriones muertos, identificados como coagulados o con ausencia de latido cardíaco, se extrajeron cada 24 h. Las placas se mantuvieron a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperíodos de luz/oscuridad natural. A las 96 hpf, se contaron los embriones supervivientes y muertos, y se calculó el porcentaje de mortalidad para construir una curva de dosis-mortalidad y para calcular la concentración letal media (CL_{50}).

El desarrollo embrionario se realizó a las 12, 24, 48, 72 y 96 h de exposición, las características morfológicas de los embriones se evaluaron utilizando un estereomicroscopio (Figura 5).

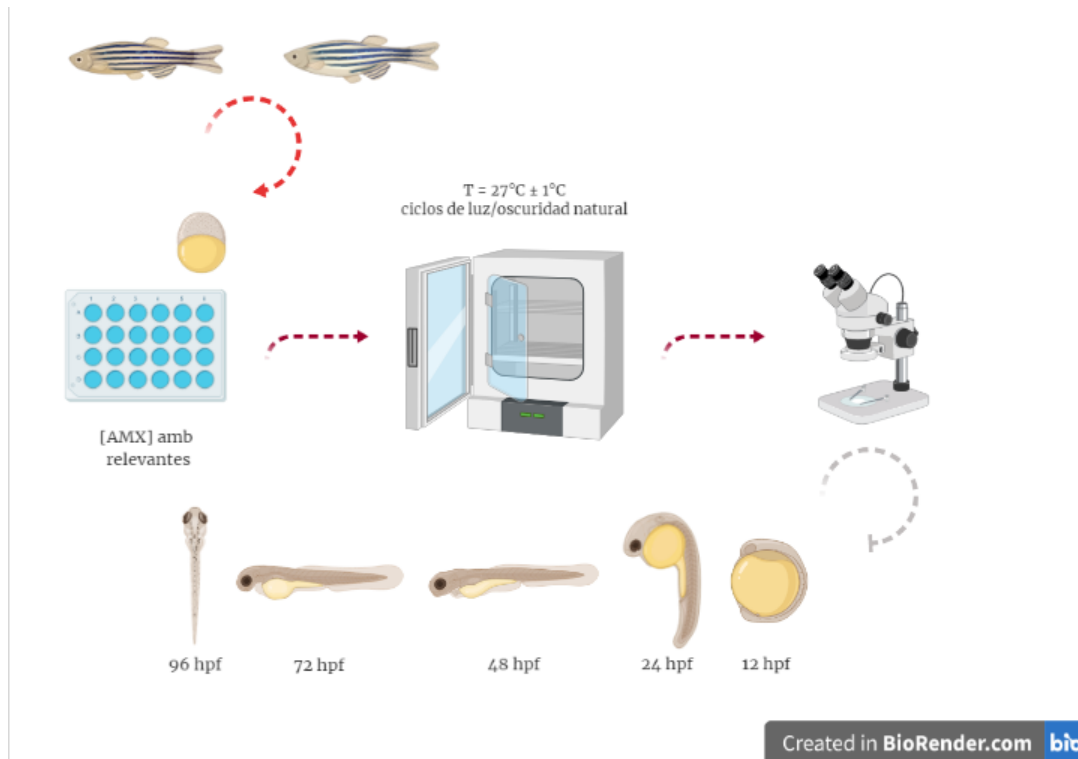


Figura 5. Evaluación teratogénica y embriotóxica de la amoxicilina en pez cebra

Esta evaluación se realizó para cada organismo en comparación con el embrión de referencia, según Kimmel et al. (1995). Cada embrión expuesto recibió una puntuación por cada uno de los factores evaluados, los cuales son: desarrollo de la cola, desarrollo ocular, formación de somitas, movimiento, latido del corazón, circulación sanguínea, pigmentación cabeza-cuerpo, pigmentación de la cola, aparición de la aleta pectoral, protuberancia bucal y eclosión; por cada anomalía o retraso presentado en alguna de las características evaluadas, se restó una unidad a la puntuación (Hermsen et al. 2011) (Figura 6). Se registraron seis categorías diferentes de anomalías que incluyen: edema pericárdico, malformación del saco vitelino, malformación de la cola, escoliosis, ausencia de la aleta pectoral y retraso en la eclosión. Las malformaciones más representativas fueron fotografiadas para su posterior descripción.
















General Morphology Score				
Hpf	12	24	48	72
Detachment of tail	 0			
	18hpf 1	2	3	3
Somite formation	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
Eye development	 1	 2	 2 + 1 for pigment	 2 + 1 for pigment
Movement	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
Heartbeat	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
Blood circulation	No = 0	No = 0	Yes = 1	Yes = 1
Pigmentation head-body	0	 0	 1	 1
Pigmentation tail	0	 0	 1	 1
Pectoral fin	0	0	 0	 1
Protruding mouth	0	0	 0	 1
Hatching	No = 0	No = 0	No = 0	Yes = 1
GMS	1	7	12	15

Figura 6. Sistema de puntuación de morfología general (Hermesen et al., 2011)

5.4. Evaluación del potencial teratogénico producido por amoxicilina sobre *D. rerio*

Para caracterizar el potencial teratogénico de la AMX, se calculó el índice teratogénico (IT), determinado con el cociente de la CL₅₀ y la concentración efectiva media de malformaciones (CE_{50m}). Si el IT es >1, la AMX se considera teratogénico y si es <1 embrioletal, según los criterios de Weigt et al., (2011).

5.5. Evaluación del estrés oxidativo (oxidación celular y actividad antioxidante) inducido por amoxicilina sobre embriones de pez cebra

Se pesó 1 g de ovocitos fecundados de pez cebra y se expusieron a concentraciones ambientalmente relevantes de AMX (0.039, 1.746, 3.453, 5.160, 6.868, 8.575, 10.282 y 11.990 $\mu\text{g L}^{-1}$) en sistemas preparados con seis litros de agua añadida con el antibiótico y un sistema control, libre de fármaco. Después de 72 y 96 hpf, los embriones se homogeneizaron en 1.5 mL de solución buffer de fosfatos (SBF, pH 7.4). Las muestras se centrifugaron a 15000 g durante 15 min a 4°C. Se determinaron biomarcadores de oxidación celular: grado de lipoperoxidación (LPX) y contenido de hidroperóxidos (HPX), y actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Figura 7). El experimento se realizó por quintuplicado.

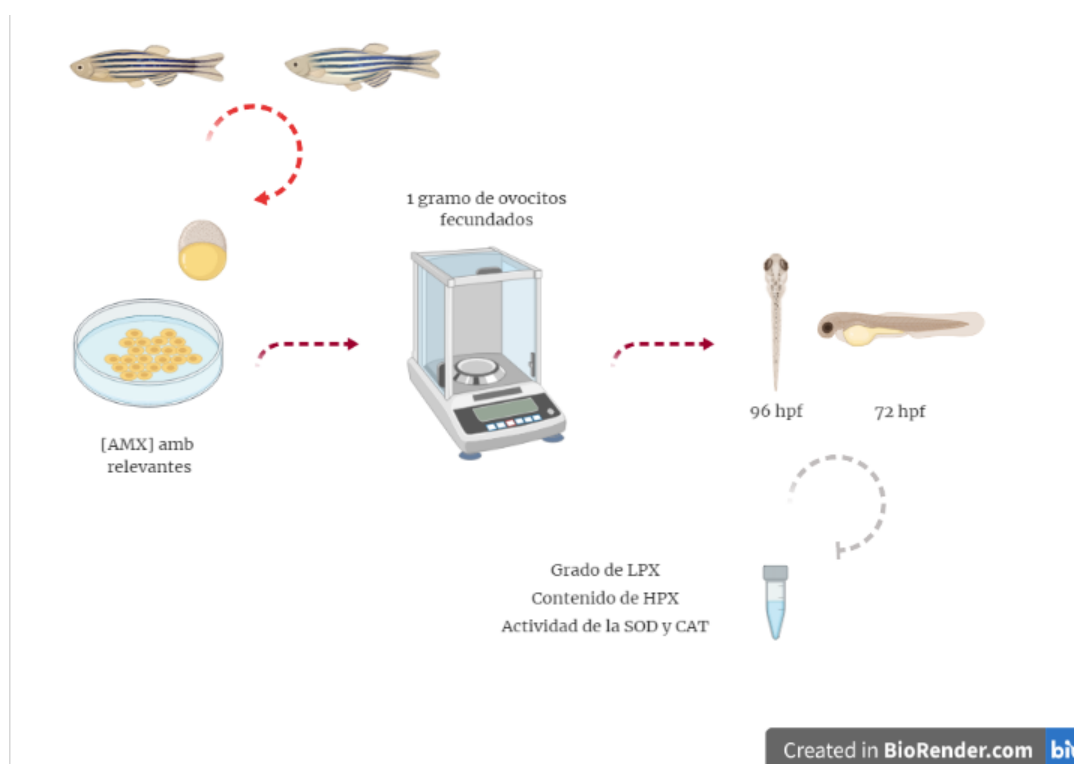


Figura 7. Evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo inducido por amoxicilina en pez cebra

5.5.1. Determinación del grado de lipoperoxidación (Buege y Aust, 1978)

A 100 μL de la muestra (sin centrifugar) se le añadió solución reguladora tris-HCl 150 mM (pH 7.4) hasta completar 1 mL y se le adicionaron 2 mL de ATC-ATB (ácido tiobarbitúrico al 0.375% en ácido tricloroacético al 15%), después se indujo un choque térmico en agua a ebullición. Se incubó a 37°C por 30 min. Concluido este tiempo, se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min y se determinó la absorbancia a 535 nm. Los resultados se expresaron en mM de malondialdehído (MDA)/mg de proteína.

5.5.2. Determinación del contenido de hidroperóxidos (Jiang et al., 1992)

A 100 μL de la muestra (previamente desproteinizada con ATC al 10%) se le agregaron 900 μL de mezcla de reacción [FeSO_4 0.25 mM, H_2SO_4 25 mM, naranja de xilenol 0.1 mM e hidroxitolueno butilado (HTB) 4 mM en metanol al 90%]. Se incubó a temperatura ambiente durante 60 min. La absorbancia se determinó a 560 nm. Los resultados se expresaron en nM de hidroperóxido de cumeno (HPC)/mg de proteína.

5.5.3. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (Misra y Fridovich, 1972)

Se colocaron 40 μL del homogenizado en una celda de cuarzo y se adicionaron 260 μL de solución amortiguadora de carbonatos [Na_2CO_3 50 mM y ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) 0.1 mM] a pH 10.2. Posteriormente se agregaron 200 μL de adrenalina 30 mM y se determinó la absorbancia a 480 nm a los 30 s y 5 min. Los resultados se expresaron en unidades internacionales (UI)/mg de proteína.

5.5.4. Determinación de la actividad de la catalasa (Radi et al., 1991)

Se colocaron 20 μL del sobrenadante en una celda de cuarzo, se le agregaron 280 μL de solución amortiguadora de aislamiento [sucrosa 0.3 M, AEDT 1 mM, ácido hidroxietilpiperazina etano sulfónico (HEPES) 5 mM y KH_2PO_4 5 mM] y 200 μL de una solución de H_2O_2 20 mM. Posteriormente se realizaron las lecturas de absorbancia a 240 nm, a los 0 y 60 s. Los resultados se expresaron en μM de H_2O_2 /mg de proteína.

5.5.5. Determinación del contenido de proteínas (Bradford, 1976)

A 25 μL del sobrenadante se le agregaron 75 μL de agua destilada y 2.5 mL del reactivo de Bradford (0.05 g de azul de Coomassie, 25 mL de etanol al 96% y 50 mL de H_3PO_4 en 500 mL de agua destilada). Se agitó, se dejó reposar por 5 min y se determinó la absorbancia a 595 nm. Los resultados se extrapolaron en una curva estándar de albúmina (Tabla 2).

Tabla 2. Curva patrón para la determinación de proteínas

Tubo	Albúmina (μL) *	Agua desionizada (μL)
1	10	90
2	25	75
3	50	50
4	75	25
5	100	0
Blanco	0	100

* de una solución de 1 gmL^{-1}

6. RESULTADOS

6.1. Embrioletalidad y teratogenicidad producidas por amoxicilina sobre *Danio rerio*

La Tabla 3 muestra los datos sobre los porcentajes de mortalidad y malformaciones de los embriones de *Danio rerio* expuestos a las diferentes concentraciones de AMX. El número de embriones muertos y malformados aumenta proporcionalmente al incremento de la concentración de AMX. El valor de la CL_{50} fue de $14.192 \mu\text{gL}^{-1}$ y de la CE_{50m} de $7.083 \mu\text{gL}^{-1}$. Con estos datos se calculó el IT que fue de 2.003. Weigt et al. (2011) estableció que, si el IT de una sustancia dada es mayor a 1, la sustancia es teratogénica y si el IT es menor a 1, la sustancia produce principalmente efectos embrioletales. Según estos criterios, la AMX se clasifica como teratogénica.

Tabla 3. Datos de mortalidad y malformaciones en embriones de *Danio rerio* expuestos a amoxicilina

Concentración de AMX (μgL^{-1})	Número de embriones expuestos	Mortalidad (%)	Malformaciones (%)
0	90	0	0
0.039	90	26.7	28.9
1.746	90	28.9	35.6
3.453	90	31.1	47.8
5.160	90	37.8	55.6
6.868	90	46.7	60.0
8.575	90	50.0	68.9
10.282	90	52.2	77.8
11.990	90	58.9	81.1
		$CL_{50} = 14.192$	$CE_{50} = 7.083$
		$IC = [10.902-28.897]$	$IC = [5.051-8.658]$
		$IT = 2.003$	

La Figura 8 muestra el aumento de la mortalidad para las concentraciones de 0.039 a $11.990 \mu\text{gL}^{-1}$, alcanzando 26.7 y 58.9%, respectivamente. La mortalidad se identificó por coagulación embrionaria y falta de latido cardíaco.

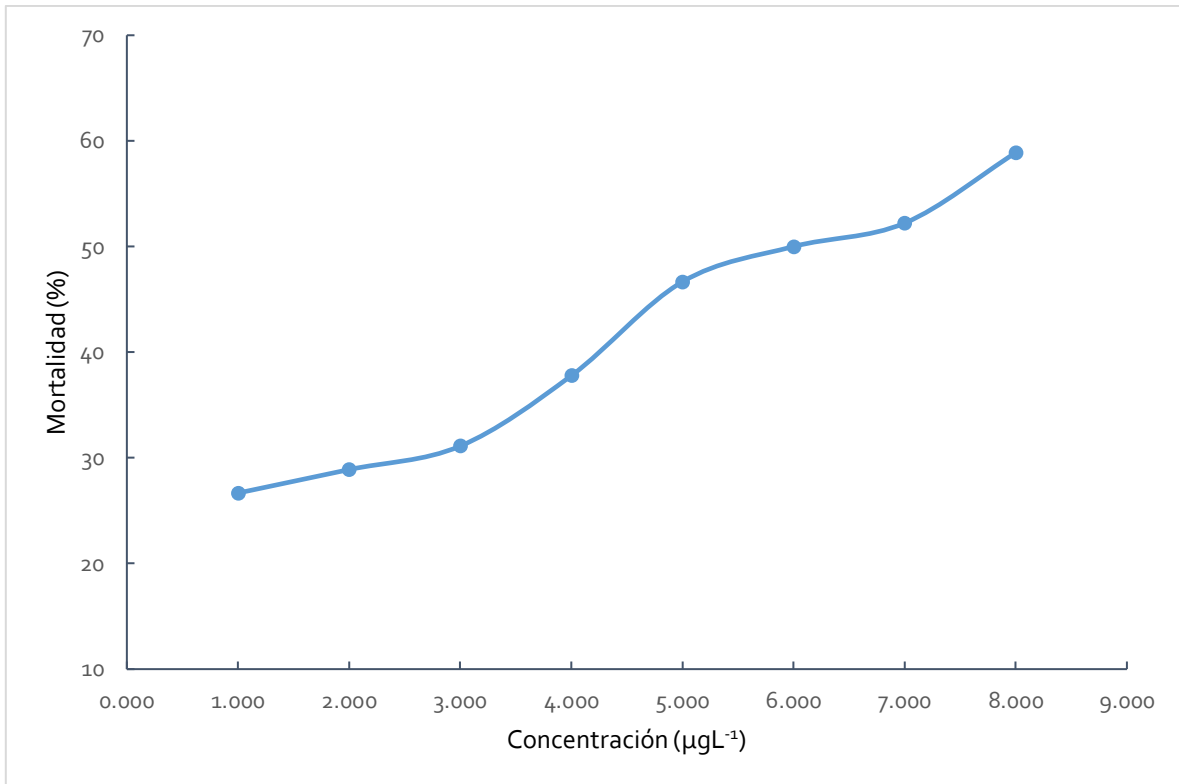


Figura 8. Mortalidad de los embriones de pez cebra expuestos a amoxicilina

Además, la Figura 9 indica que a medida que aumenta la concentración de AMX, la tasa de malformación también aumenta, mientras que la tasa de supervivencia disminuye.

Durante el periodo de exposición, se observaron deformaciones en todos los grupos de tratamiento en una relación dependiente de la concentración. Algunos embriones sobrevivieron incluso con malformaciones.

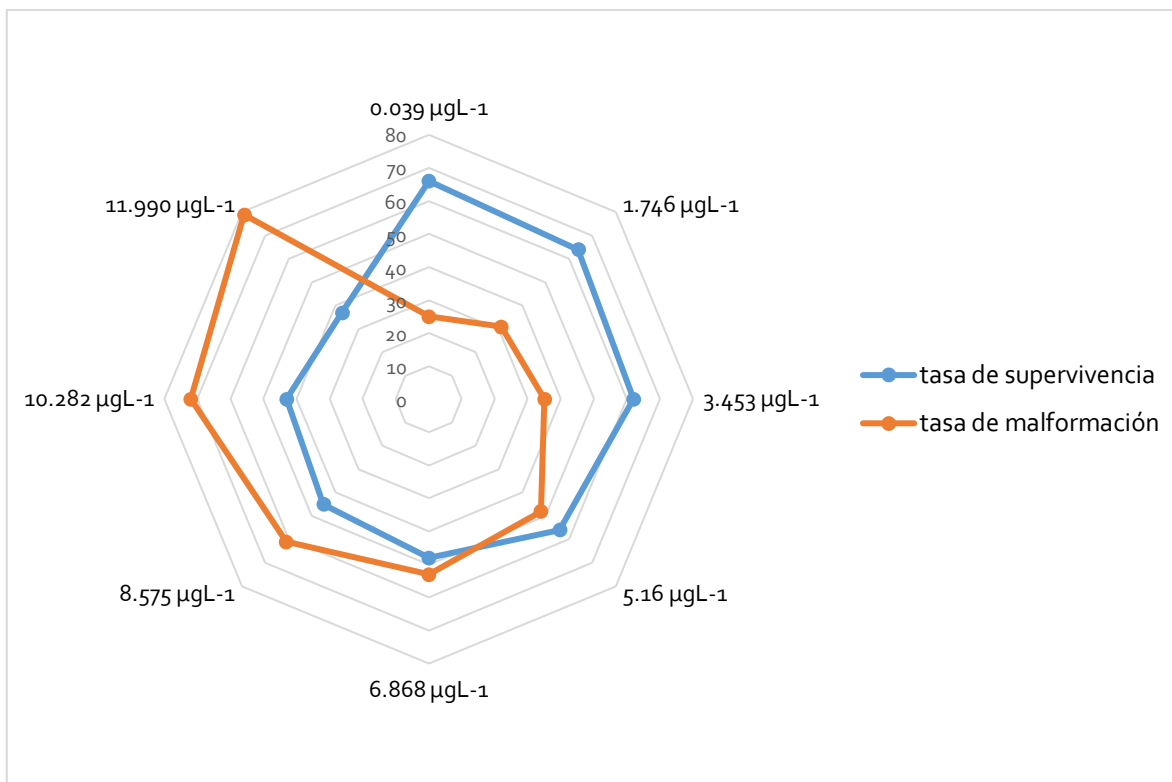


Figura 9. Tasa de supervivencia y malformación de embriones de pez cebra expuestos a amoxicilina

En la Figura 10, se observa el número de embriones normales, muertos y malformados en cada concentración de AMX utilizada en el experimento. De la concentración de 0.039 a 3.453 µgL⁻¹ y de 5.160 a 8.575 µgL⁻¹ los embriones presentaron un número similar de malformaciones. El número de embriones normales disminuyó proporcionalmente a la concentración de AMX. Estos datos son consistentes con la Figura 12, donde podemos observar que en la concentración más alta de AMX se observa un mayor número de alteraciones teratogénicas.

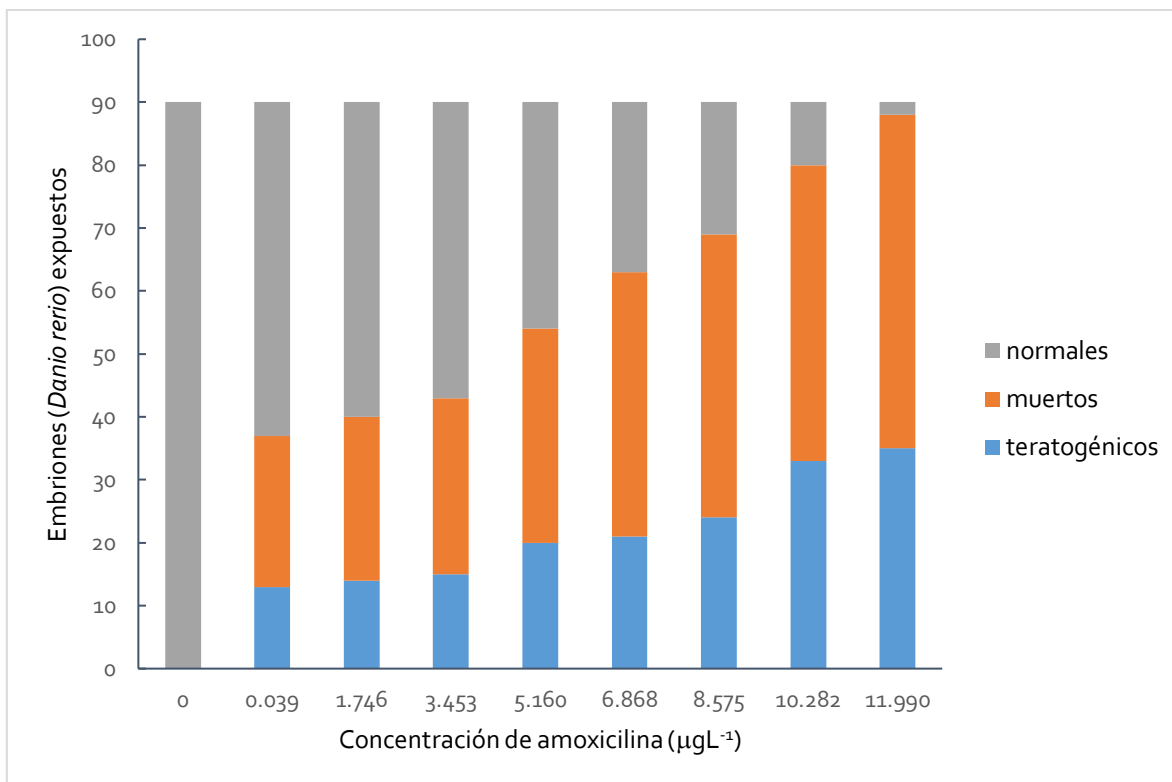


Figura 10. Efectos en embriones de *Danio rerio* expuestos a diferentes concentraciones de amoxicilina

6.2. Malformaciones producidas por amoxicilina en embriones de *Danio rerio*

En la Figura 11 se muestran los promedios de las puntuaciones obtenidas por los embriones de *Danio rerio* en cada una de las concentraciones probadas de AMX. La puntuación más alta obtenida fue en el control, ya que el desarrollo de los embriones fue normal. A medida que aumenta la concentración de AMX, la puntuación disminuye debido a todas las alteraciones del desarrollo y los efectos teratogénicos observados ($p < 0.05$). Todas las disminuciones fueron estadísticamente significativas con respecto a la puntuación del control y en todos los tiempos de exposición.

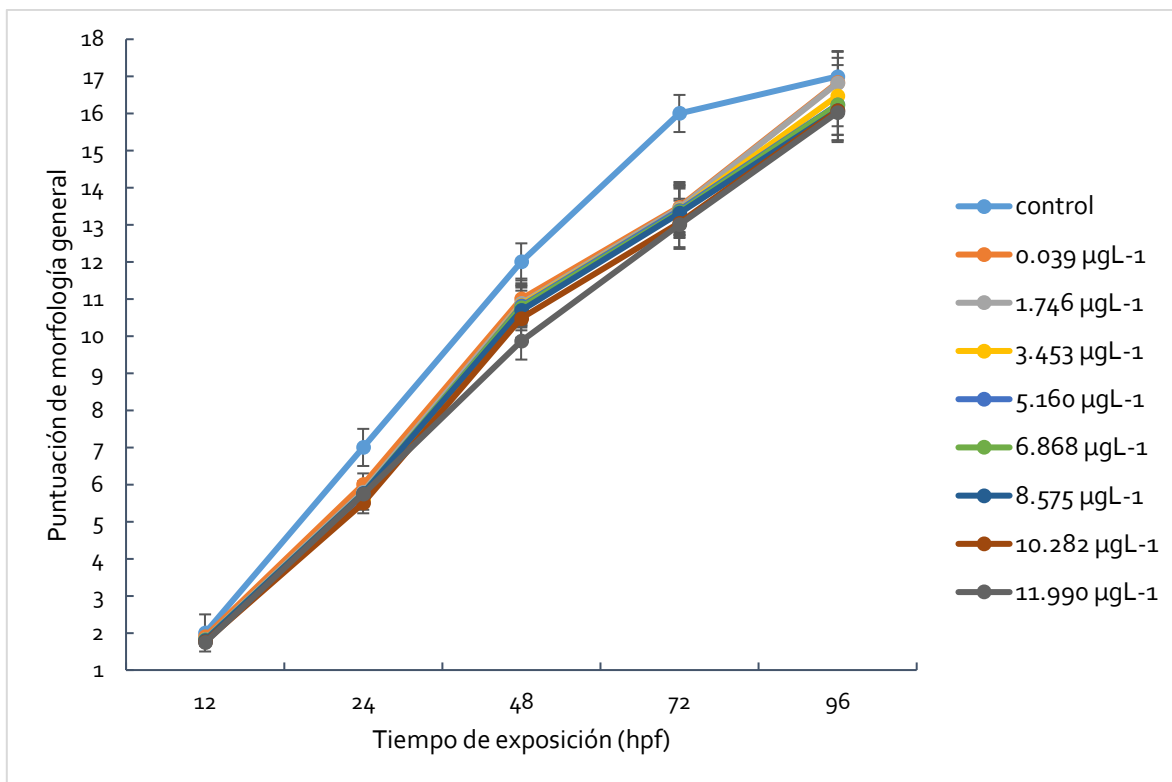


Figura 11. Curvas concentración-respuesta de amoxicilina en embriones de *Danio rerio*

La Figura 12 ilustra la frecuencia de las alteraciones teratogénicas observadas en los embriones y larvas de *Danio rerio* expuestos a las diferentes concentraciones de AMX. Las más frecuentes fueron: malformación de la cola, edema pericárdico, malformación del saco vitelino, escoliosis, ausencia de la aleta pectoral y retraso en la eclosión (Tabla 4). Las concentraciones más altas de AMX (10.282 y 11.990 µg/L⁻¹) mostraron aproximadamente 30-31% de ausencia de la aleta pectoral y 37-39% de retraso en la eclosión. En contraste, las concentraciones más bajas de AMX (0.039 y 1.746 µg/L⁻¹) mostraron aproximadamente un 7-10% de ausencia de la aleta pectoral y un 14-16% de retraso en la eclosión.

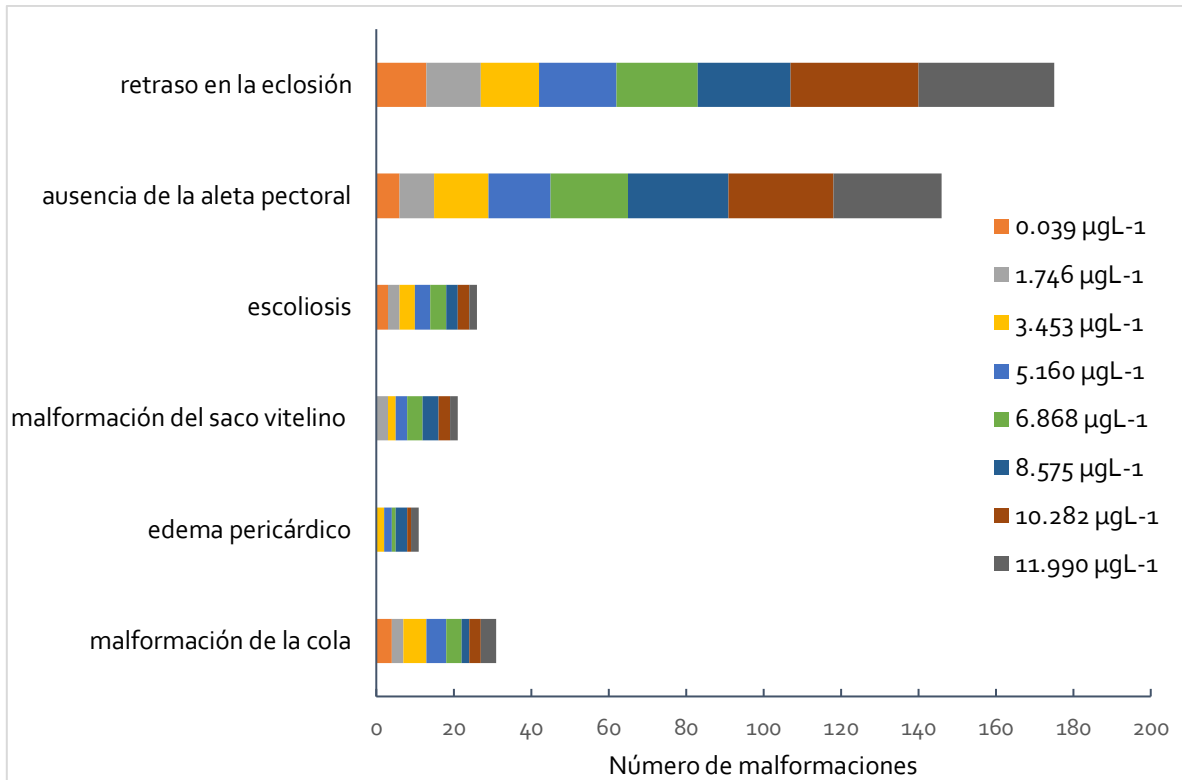
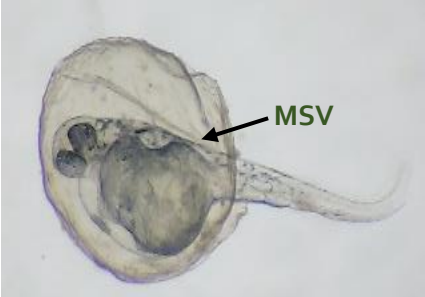

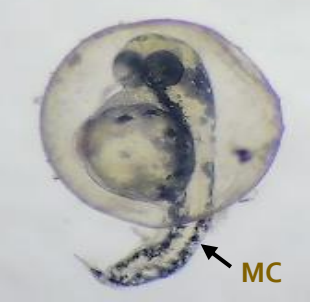
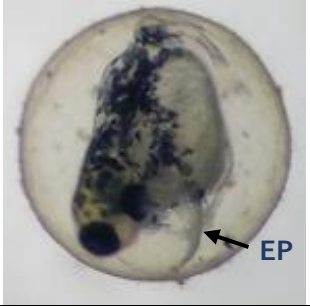
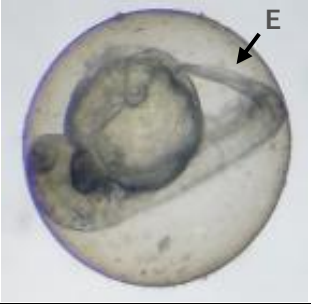
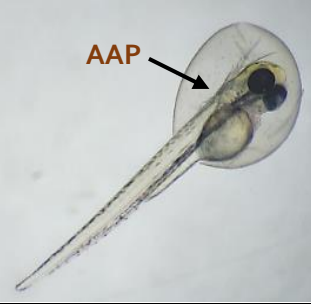


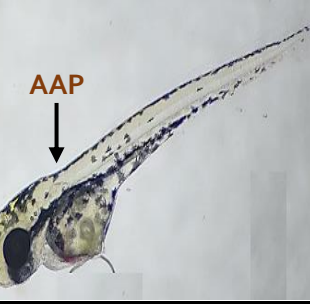
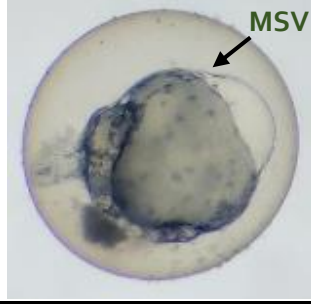
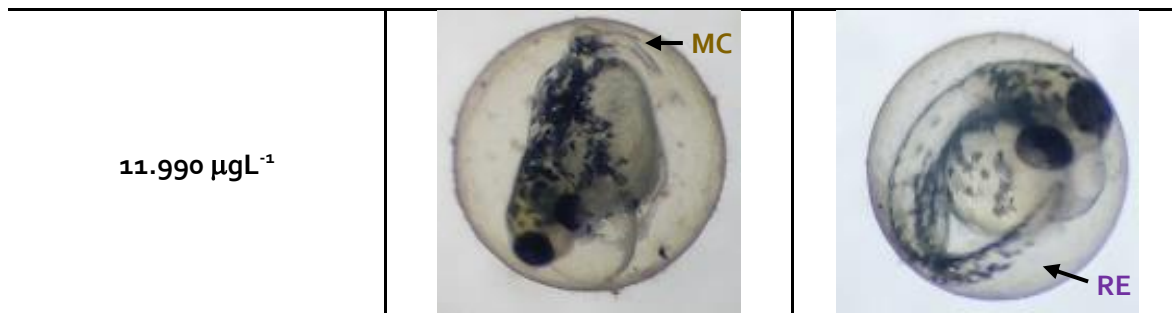


Figura 12. Malformaciones producidas en embriones de *Danio rerio* por exposición a amoxicilina

Tabla 4. Principales malformaciones identificadas en embriones de pez cebra por exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de amoxicilina

Concentración de AMX	Malformaciones
0.039 µgL ⁻¹	
1.746 µgL ⁻¹	

<p>3.453 μgL^{-1}</p>		
<p>5.160 μgL^{-1}</p>		
<p>6.868 μgL^{-1}</p>		
<p>8.575 μgL^{-1}</p>		
<p>10.282 μgL^{-1}</p>		



MC: malformación de la cola, **EP:** edema pericárdico; **MSV:** malformación del saco vitelino; **E:** escoliosis;
AAP: ausencia de la aleta pectoral; **RE:** retraso en la eclosión

6.3. Estrés oxidativo inducido por amoxicilina sobre embriones de pez cebra

Las Figuras 13 y 14 muestran los biomarcadores de oxidación celular y antioxidación a 72 y 96 hpf. Como puede observarse, los valores de todos los biomarcadores se incrementan (con respecto al grupo control) al tiempo de exposición de forma estadísticamente significativa y dependiente de la concentración en los embriones de *Danio rerio*. Se observaron incrementos de hasta el 48 y 49% a las 72 y 96 hpf, respectivamente para el grado de LPX y del 88 y 58% (a las 72 y 96 hpf) para el contenido de HPX, con respecto a los grupos control ($p < 0.05$). Para la actividad antioxidante, se observaron incrementos de hasta el 105 y 153% a las 72 y 96 hpf, respectivamente en la actividad de la SOD y del 541 y 180 (a las 72 y 96 hpf) en la actividad de la CAT, en relación con los grupos control ($p < 0.05$). Estos aumentos dependieron del tiempo y la concentración en todos los casos.

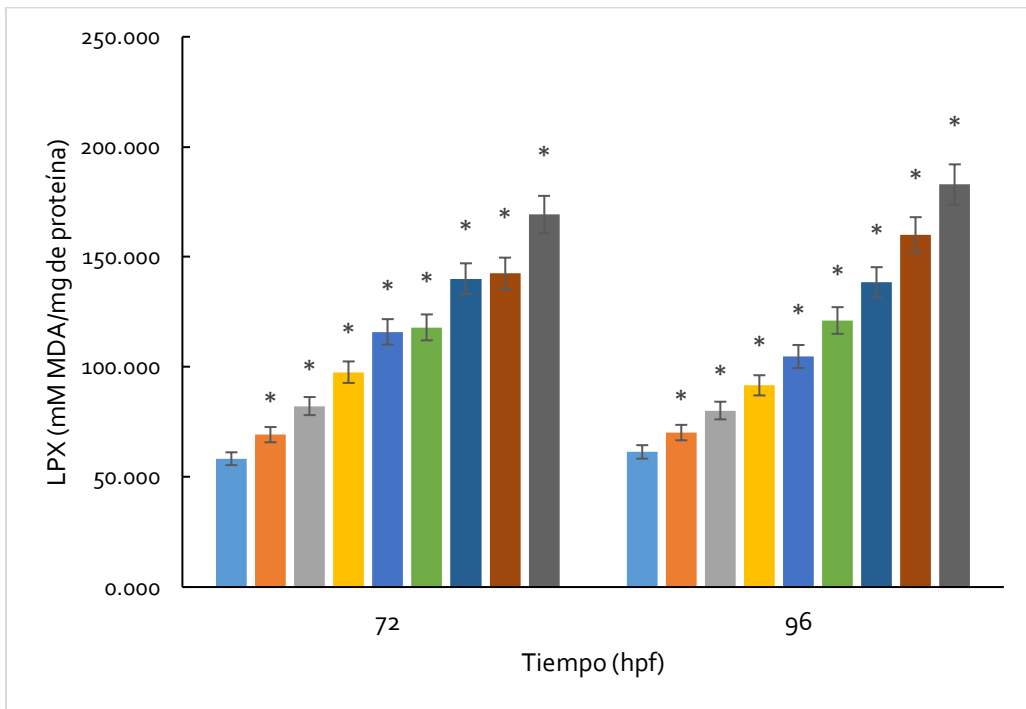
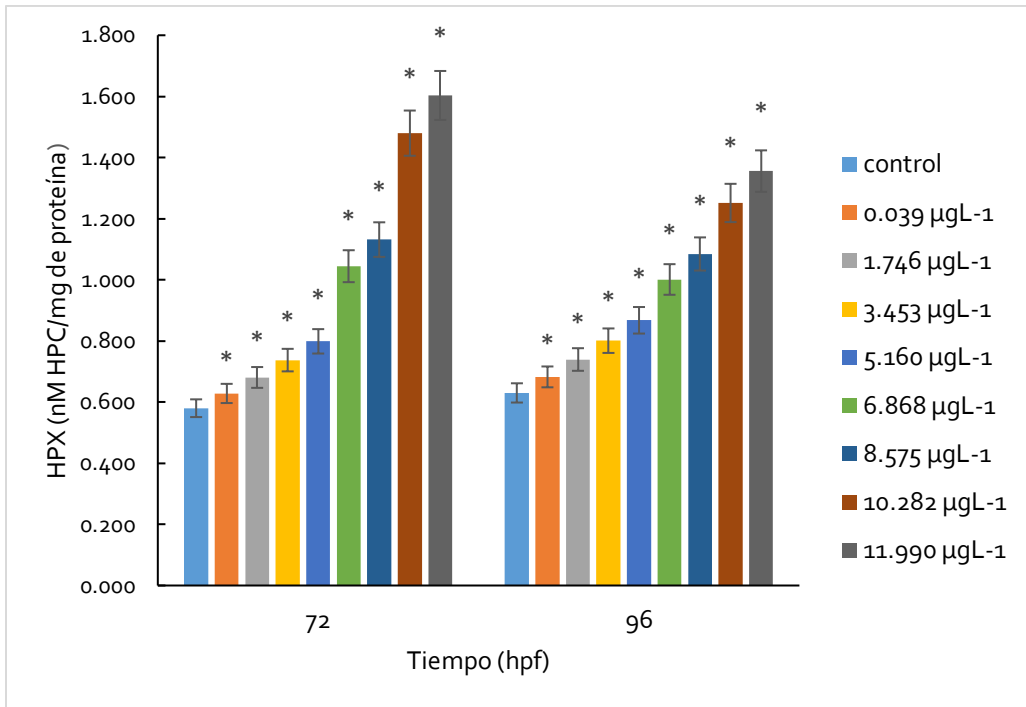


Figura 13. Biomarcadores de oxidación celular en embriones de *Danio rerio* expuestos a amoxicilina

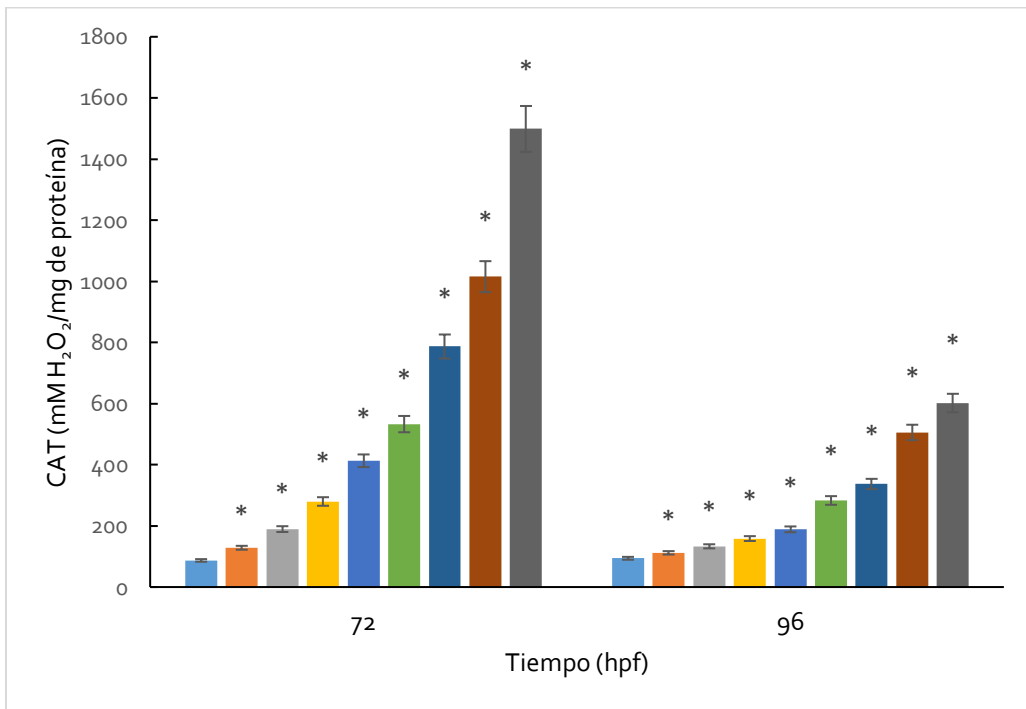
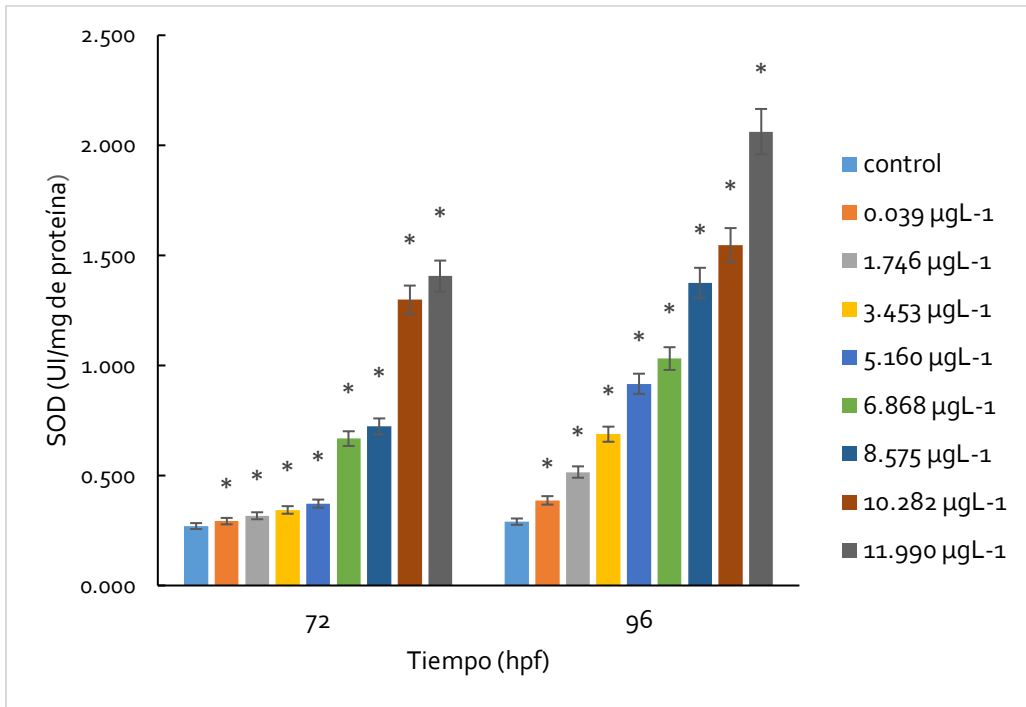


Figura 14. Actividad de las enzimas antioxidantes en embriones de *Danio rerio* expuestos a amoxicilina

7. DISCUSIÓN

Los antibióticos son sustancias biológicamente activas y pueden inhibir la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y paredes celulares (Ma et al., 2016; Faghieh et al., 2017); también pueden inhibir la replicación del ADN y la división celular (Sass y Brotz-Oesterhelt, 2013 ; van Eijk et al., 2017). Los antibióticos no se eliminan por completo después del tratamiento de las aguas residuales y, por lo tanto, los ecosistemas acuáticos están continuamente expuestos (Straub et al., 2012; Sinthuchai et al., 2016). Las bajas concentraciones de antibióticos causan toxicidad en los organismos acuáticos, pero los efectos en los peces se notifican con menos frecuencia que en los microorganismos (Fent et al., 2006; Santos et al., 2010).

En el medio acuático, pocos estudios han reportado los efectos de la AMX en peces, probablemente porque este fármaco no está descrito como altamente tóxico en la literatura científica (96h-CL₅₀ = 1000 mgL⁻¹ para *Oryzias latipes*, según Park y Choi (2008). En un estudio realizado por Oliveira et al. (2013) la AMX causó eclosión prematura y desarrollo anormal de embriones de pez cebra (48h-CE₅₀ = 132.4 mgL⁻¹), las malformaciones más frecuentes fueron edemas y deformidades de la cola.

Para esta investigación decidimos trabajar con AMX en concentraciones ambientalmente relevantes (0.039 a 11.990 µgL⁻¹), ya que estas están presentes en cuerpos de agua y son el indicio de la presencia de este antibiótico en el mundo. Nuestro estudio muestra que la exposición a AMX durante 96 h induce ausencia de la aleta pectoral y retardo en la eclosión (CE_{50m} = 7.083 µgL⁻¹), como las malformaciones más frecuentes.

Ya se describió la eclosión por inhibición para la kanamicina (Song et al., 2010; Wang et al., 2013). El proceso de eclosión se basa en una combinación de mecanismos químicos, osmóticos y mecánicos (musculares) (Denucé, 1985; Yamagani, 1988). Diferentes mecanismos tóxicos podrían justificar el retraso de la eclosión en los embriones de peces,

como la inhibición de la enzima de eclosión (corionasa), alteraciones osmóticas que interfieren con la actividad de la enzima corionasa y/o la incapacidad de las larvas emergentes para romper el corion (Dave y Xiu, 1991; Hallare et al., 2005).

Otras anomalías observadas fueron: malformación de la cola, edema pericárdico, malformación del saco vitelino y escoliosis.

En el pez cebra, el corazón es el primer órgano en desarrollarse y funcionar; por lo tanto, parece ser un objetivo principal en la toxicidad para el desarrollo. La aparición de edema pericárdico es un indicador de desarrollo cardíaco anormal (Hill et al., 2005). El edema pericárdico también puede ser un indicador de disfunción osmótica o metabólica (Hill et al., 2004). Algunos resultados sugieren que el edema del saco vitelino puede inhibir el suministro de nutrientes al corazón, lo que resulta en un edema pericárdico (Mu et al., 2013).

Las malformaciones de la columna vertebral (como la escoliosis) pueden ser la consecuencia de una señalización Wnt desregulada o de una disminución del colágeno en la columna vertebral (Çelik et al., 2012). Las malformaciones de la columna también pueden estar relacionadas con el agotamiento o la desregulación de los iones de calcio y fósforo, que son necesarios para el desarrollo normal del pez cebra (Muramoto, 1981).

En resumen, estos resultados demuestran que la AMX interfiere con el desarrollo normal del pez cebra. Podría deberse a que la AMX, al actuar como hapteno, conduce a la activación de clones de células T contra inmunoglobulinas específicas de penicilina, que se unen a antígenos de AMX, formando complejos que activan la respuesta inmunoalérgica (Kormoczi et al., 2001; Aldini et al., 2006; Oettl y Stauber, 2007). La función de las células inmunitarias está relacionada con la producción de EROs, pero cantidades excesivas de EROs pueden convertirse en una fuente de daño tisular al atacar diferentes componentes celulares y causar la muerte celular por EOX (Aderem y Underhill, 1999).

Se observaron efectos teratogénicos en la columna vertebral, la cola, el saco vitelino y el corazón a concentraciones más bajas que las que causan letalidad, lo que indica que la AMX es un teratógeno.

Varios agentes bactericidas, como los β -lactámicos, las quinolonas y los aminoglucósidos, pueden inducir la generación de EROs, moléculas altamente dañinas que pueden inhibir la mayoría de las funciones celulares (Kohanski et al., 2010).

El EOx inducido por AMX, demostrado por algunos autores, puede alterar la integridad de biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN, además de asociarse con trastornos que podrían afectar la fertilidad, la salud y el ciclo de vida de los peces, como ha sido demostrado por Theodorakis et al. (2000), y provocar genotoxicidad (Anlas y Ustuner, 2016) y citotoxicidad.

Existe evidencia de que el oxígeno juega un papel decisivo en el metabolismo de los embriones y es crítico en el desarrollo embrionario temprano. Las EROs tienen funciones de señalización e intervienen en muchos procesos fisiológicos en el organismo en desarrollo. Durante la embriogénesis, las EROs controlan la división celular y la maduración de los ovocitos, así como la implantación y formación de blastocistos. Cuando las EROs no están debidamente reguladas, tienden a generar EOx y consecuentemente, embriotoxicidad. Por tanto, la defensa antioxidante juega un papel vital en la protección de los organismos en formación, ya que los agentes prooxidantes podrían elevar la concentración de EROs e inducir daño oxidativo en los ovocitos, alteraciones mitocondriales, agotamiento de ATP, daño al ADN, lipoperoxidación, apoptosis, y/o retraso en todo el proceso de desarrollo embrionario (Pašková et al., 2011).

En este estudio, corroboramos que la AMX puede inducir EOx en embriones y larvas de pez cebra. Además, a las 72 y 96 hpf, este antibiótico fue capaz de aumentar el nivel de

biomarcadores de oxidación celular (LPX y HPC) en todas las concentraciones ensayadas, con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

En 2007, se propuso un mecanismo novedoso mediante el cual los antibióticos bactericidas (como los β -lactámicos) inducen la muerte celular bacteriana. Este mecanismo involucra la producción de radicales hidroxilo (Dwyer et al., 2007; Kohanski et al., 2007).

Las EROs participan en el desarrollo embrionario, al modular las vías de señalización que promueven la diferenciación, proliferación y apoptosis (Dennerly, 2007). El exceso de EROs conduce a EROx y a la alteración de las vías de señalización sensibles a redox, algunas de las cuales están asociadas con la dismorfogénesis (Ozolins y Hales, 1997). Durante la organogénesis media, un período en el que el embrión experimenta un rápido crecimiento y diferenciación celular que conduce a cambios estructurales importantes, las EROs pueden intervenir en la mediación de la agresión teratogénica (Schlisser et al., 2010).

Además, durante la organogénesis, el EROx modifica post-traduccionamente los factores de transcripción regulados por redox, con cambios posteriores en la expresión génica en el embrión (Dennerly, 2007).

Nuestros resultados de embrioletalidad muestran que las malformaciones en los embriones de pez cebra fueron más frecuentes a concentraciones más altas de AMX.

Dos estudios recientes, llevados a cabo por nuestro grupo de investigación demostraron que, 1) la AMX a concentraciones de 10 ngL^{-1} y $10 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ generó un aumento en los niveles de LPX, HPX y CPC, así como en la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPX en cerebro, riñón y branquias de *Cyprinus carpio* (Elizalde-Velázquez et al., 2017), y 2) la AMX en concentraciones ambientalmente relevantes, 0.039 y $1.67 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$, fue capaz de generar genotoxicidad y efectos citotóxicos en células sanguíneas de la carpa común (Orozco-Hernández et al., 2019).

Por otro lado, la eclosión es una de las etapas importantes en la embriogénesis (Yumnamcha et al., 2015). El desarrollo del embrión está relacionado con la tasa de eclosión (Dave y Xiu, 1991). Estos cambios en la tasa de eclosión pueden deberse al efecto tóxico que generan las EROs en el corion. Creemos que esto está relacionado con la inhibición de enzimas importantes en el proceso de eclosión, como la corionasa (Haendel et al., 2004).

Las EROs aumentan la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Blahova et al., 2013). En este estudio, se observó que el grado de lipoperoxidación aumenta de forma dependiente de la concentración de AMX. Los resultados muestran que el grado de lipoperoxidación se correlaciona con cambios en los niveles de las enzimas antioxidantes (SOD y CAT). La SOD y la CAT juegan un papel fundamental en la protección de las células al EOX. En nuestra investigación se encontró que la actividad de la SOD y la CAT aumenta drásticamente en los embriones tratados con AMX, en comparación con el control.

Una mayor cantidad de EROs puede causar apoptosis durante la embriogénesis (Shi y Zhou, 2010; Khazaei y Aghaz, 2017). La señal de apoptosis es resultado del efecto químico tóxico. La continuación de la señalización de la apoptosis conduce a la peroxidación de lípidos y muerte celular (Fulda et al., 2010; Weinberg et al., 2016).

Por último, un valor de IT mayor se asocia a un agente tóxico que produce amplias separaciones entre las curvas dosis-respuesta de malformación y letalidad. Es posible tener un agente tóxico que cause malformaciones graves, pero no mortalidad; a la inversa, una sustancia química potencialmente tóxica para el desarrollo puede ser tan letal que no se observen malformaciones (Reimers et al., 2004). La AMX es un fármaco clasificado como categoría B en el por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), pero nuestro estudio mostró un valor poco mayor a 2 en el IT.

8. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este estudio ($CL_{50} = 14.192 \mu\text{gL}^{-1}$ y $CE_{50} = 7.083 \mu\text{gL}^{-1}$) mostraron un índice teratogénico de 2.003, revelando que la AMX es un antibiótico que puede generar embriotoxicidad y teratogenicidad en el pez cebra (*Danio rerio*). La AMX, en concentraciones ambientalmente relevantes (0.039 - $11.990 \mu\text{gL}^{-1}$) es capaz de inducir alteraciones en el desarrollo embrionario y efectos teratogénicos en ovocitos y embriones de pez cebra. Las principales malformaciones identificadas fueron: malformación de la cola, edema pericárdico, malformación del saco vitelino, escoliosis, ausencia de la aleta pectoral y retardo en la eclosión. Tales malformaciones embrionarias pueden ser causadas por EOX inducido por EROs. El análisis de los resultados nos permite concluir que la AMX, en concentraciones ambientalmente relevantes, es capaz de inducir efectos embriotóxicos y teratogénicos, representando un riesgo para los organismos acuáticos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aceto A, Amicarelli F, Sacchetta P, Dragani B, Bucciarelli T, Masciocco L, et al. Developmental aspects of detoxifying enzymes in fish (*Salmo iridaeus*). Free Radic Res. 1994; 21(5): 285-294

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol. 1999; 17: 593-623

Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril. 2003; 79(4): 829-843

Aitken RJ & Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction. 2001; 122(4): 497-506

Aldini G, Gamberoni L, Orioli M, Beretta G, Regazzoni L, Facino RM, et al. Mass spectrometric characterization of covalent modification of human serum albumin by 4-hydroxy-trans-2-nonenal. J Mass Spectrom. 2006; 41(9):1149-1161

Allen RG & Balin AK. Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. Free Radic Biol Med. 1989; 6(6): 631-661

Andreozzi R, Caprio V, Ciniglia C, De Champdoré M, Lo Giudice R, Marotta R, et al. Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. Environ Sci Technol. 2004; 38(24): 6832-6838

Anguiano OL, Caballero de Castro A, Pechen de D'Angelo AM. The role of glutathion conjugation in the regulation of early toad embryos' tolerance to pesticides. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2001; 128(1): 35-43

Ankley GT, Degitz SJ, Diamond SA, Tietge JE. Assessment of environmental stressors potentially responsible for malformations in North American anuran amphibians. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2004; 58(1): 7-16

Anlas C, Ustuner O. Genotoxic assessment of amoxicillin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by comet assay and micronucleus test. *Fresenius Environ Bull.* 2016; 25(12): 5358-5364

Arun S & Subramanian P. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1998; 121(3): 273-277

Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2005; 140(2): 175-186

Barros TP, Alderton WK, Reynolds HM, Roach AG, Berghmans S. Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2008; 154(7): 1400-1413

Beckman DA & Brent RL. Mechanisms of teratogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1984; 24: 483-500

Blahová J, Plhalová L, Hostovský M, Divišová L, Dobšíková R, Mikulíková I, et al. Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. *Food Chem Toxicol.* 2013; 61: 82-85

Blaustein AR & Johnson PTJ. The complexity of deformed amphibians. *Front Ecol Environ.* 2003; 1(2): 87-94

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254

Brain RA, Johnson DJ, Richards SM, Sanderson H, Sibley PK, Solomon KR. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environ Toxicol Chem.* 2004; 23(2): 371-382

Breton R & Boxall A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: regulatory drivers and research needs. *QSAR Comb Sci.* 2003; 22(3): 399-409

Buege JA & Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52: 302-310

Castiglioni S, Bagnati R, Calamari D, Fanelli R, Zuccato E. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *J Chromatogr A.* 2005; 1092(2): 206-215

Çelik ES, Kaya H, Yılmaz S. Effects of phosalone on mineral contents and spinal deformities in common carp (*Cyprinus carpio*, L. 1758). *Turkish J Fish Aquat Sci.* 2012; 12: 259-264

Chen, J, Patel R, Friedman TC, Jones KS. The behavioral and pharmacological actions of NMDA receptor antagonism are conserved in zebrafish larvae. *Int J Comp Psychol.* 2010; 23(1): 82-90

Ciereszko A, Dabrowski K, Lin F, Liu L. Protective role of ascorbic acid against damage to male germ cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can J Fish Aquat Sci.* 1999; 56(2): 178-183

Clark KJ & Ekker SC. How zebrafish genetics informs human biology. Nature Education. 2015; 8(4): 3

Covarrubias L, Hernández-García D, Schnabel D, Salas-Vidal E, Castro-Obregón S. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? Dev Biol. 2008; 320(1): 1-11

Dandapat J, Chainy GBN, Rao KJ. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2003; 135C(3): 221-233

Dave G, Xiu RQ. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish *Brachydanio rerio*. Arch Environ Contam Toxicol. 1991; 21(1): 126-134

Dave G, Xiu RQ. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch Environ Contam Toxicol. 1991; 21(1): 126-134

De la Lanza-Espino G, Hernández-Pulido S, Carbajal-Pérez JL. Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores). México: Plaza y Valdés; 2000. p. 633

de Lamirande E & Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. Hum Reprod. 1995; 10(Suppl 1): 15-21

De Magalhães JL & Borschiver S. Amoxicillin and ampicillin: import trends and increasing use in Brazil. Chemistry Today. 2012; 30(5): 91-93

Dennery PA. Effects of oxidative stress on embryonic development. Birth Defects Res C Embryo Today. 2007; 81: 155-162

Denucé JM. How embryos escape from their envelopes: a new look at the (phylogenetically) old problem of hatching. Meded Kon Acad Wet Belgie. 1985; 46: 1-30

Dietrich GJ, Szpyrka A, Wojtczak M, Dobosz S, Goryczko K, Zakowski L, et al. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Theriogenology. 2005; 64(8): 1809-1822

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002; 82(1): 47-95

Dwyer DJ, Kohanski MA, Hayete B, Collins JJ. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. Mol Syst Biol. 2007; 3(1): 3-91

Ebele AJ, Abdallah MA-E, Harrad S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. Emerg Contam. 2017; 3(1): 1-16

Elizalde-Velázquez A, Martínez-Rodríguez H, Galar-Martínez M, Dublán-García O, Islas-Flores H, Rodríguez-Flores J, et al. Effect of amoxicillin exposure on brain, gill, liver, and kidney of common carp (*Cyprinus carpio*): the role of amoxicilloic acid. Environ Toxicol. 2017; 32(4): 1102-1120

Faghih O, Zhang Z, Ranade RM, Gillespie JR, Creason SA, Huang W, et al. Development of methionyl-tRNA synthetase inhibitors as antibiotics for Gram-positive bacterial infections. Antimicrob Agents Chemother. 2017; 61(11)

Fatta-Kassinou D, Meric S, Nikolaou A. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 399(1): 251-275

Fent K, Weston AA, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 2006; 76(2): 122-159

Feugang J-M, de Roover R, Moens A, Léonard S, Dessy F, Donnay I. Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology.* 2004; 61(1): 71-90

Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(24): 11003-11006

Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol.* 2010; 2010: 214074

Gerhardt AL. Bioindicator species and their use in biomonitoring. *Environmental monitoring, Volume I. Encyclopedia of life support systems.* UK: EOLSS; 2002. p. 50

Gibs J, Heckathorn HA, Meyer MT, Klapinski FR, Alebus M, Lippincott RL. Occurrence and partitioning of antibiotic compounds found in the water column and bottom sediments from a stream receiving two wastewater treatment plant effluents in northern New Jersey, 2008. *Sci Total Environ.* 2013; 458-460: 107-116

Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update. 2001; 7(2): 175-189

Haendel MA, Tilton F, Bailey GS, Tanguay RL. Developmental toxicity of the dithiocarbamate pesticide sodium metam in zebrafish. Toxicol Sci. 2004; 81(2): 390-400

Hallare AV, Schirling M, Luckenbach T, Köhler H-R, Triebkorn R. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. J Therm Biol. 2005; 30(1): 7-17

Halling-Sørensen B, Lützhøft H, Andersen HR, Ingerslev F. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. J Antimicrob Chemother. 2000; 46(Suppl 1): 53-58

Hayes TB, Case P, Chui S, Chung D, Haeffele C, Haston K, et al. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? Environ Health Perspect. 2006; 114(Suppl 1): 40-50

Heberer T & Stan H-J. Determination of clofibric acid and N-(phenylsulfonyl)-sarcosine in sewage, river and drinking water. Int J Environ Anal Chem. 1997; 67(1-4): 113-124

Hermsen SAB, van den Brandhof E-J, van der Ven LTM, Piersma AH. Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their *in vivo* potencies. Toxicol In Vitro. 2011; 25(3): 745-753

Hignite C & Azarnoff DL. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. Life Sci. 1977; 20(2): 337-341

Hill AJ, Bello SM, Prasch AL, Peterson RE, Heideman W. Water permeability and TCDD-induced edema in zebrafish early-life stages. *Toxicol Sci.* 2004; 78(1): 78-87

Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 2005; 86(1): 6-19

Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 2005; 86(1): 6-19

Huerta B, Marti E, Gros M, López P, Pompêo M, Armengol J, et al. Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. *Sci Total Environ.* 2013; 456-457: 161-170

Ji K, Kim S, Han S, Seo J, Lee S, Park Y, et al. Risk assessment of chlortetracycline, oxytetracycline, sulfamethazine, sulfathiazole, and erythromycin in aquatic environment: are the current environmental concentrations safe? *Ecotoxicology.* 2012; 21(7): 2031-2050

Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem.* 1992; 202(2): 384-389

Johnson AC, Keller V, Dumont E, Sumpter JP. Assessing the concentrations and risks of toxicity from the antibiotics ciprofloxacin, sulfamethoxazole, trimethoprim and erythromycin in European rivers. *Sci Total Environ.* 2015; 511: 747-755

Kaseva ME, Mwegoha WJS, Kihampa C, Matiko S. Performance of a waste stabilization pond system treating domestic and hospital wastewater and its implications to the aquatic environment - a case study in Dar es Salaam, Tanzania. *Journal of Building and Land Development.* 2008; 15(1-2): 76-88

Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2007; 1161(1-2): 132-145

Khazaei M, Aghaz F. Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during in vitro maturation of oocytes. *Int J Fertil Steril*. 2017; 11(2): 63-70

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995; 203(3): 253-310

Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ. Sub-lethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell*. 2010; 37(3): 311-320

Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. 2007; 130(5): 797-810

Kormoczi GF, Wölfel UM, Rosenkranz AR, Hörl WH, Oberbauer R, Zlabinger GJ. Serum proteins modified by neutrophil-derived oxidants as mediators of neutrophil stimulation. *J Immunol*. 2001; 167(1): 451-460

Kümmerer K. Antibiotics in aquatic environment - a review - part II. *Chemosphere*. 2009; 75(4): 435-441

Kümmerer K. Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52(1): 5-7

Liu Y, Wang F, Chen X, Zhang J, Gao B. Cellular responses and biodegradation of amoxicillin in *Microcystis aeruginosa* at different nitrogen levels. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015; 111: 138-145

Ma C, Yang X, Lewis PJ. Bacterial transcription as a target for antibacterial drug development. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016; 80(1): 139-160

Manzetti S & Ghisi R. The environmental release and fate of antibiotics. *Mar Pollut Bull.* 2014; 79(1-2): 7-15

Maria VL, Ahmad I, Oliveira M, Serafim A, Bebianno MJ, Pacheco M, et al. Wild juvenile *Dicentrarchus labrax* L. liver antioxidant and damage responses at Aveiro Lagoon, Portugal. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009; 72(7): 1861-1870

Meteyer CU. Field guide to malformations of frogs and toads: with radiographic interpretations. USA: U.S. Geological Survey; 2000. p. 20

Misra HP & Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; 247(10): 3170-3175

Montague P. Drugs in the water. Rachel's Environment & Health Weekly # 614. Environmental Research Foundation, USA. 1998

Moreno-Fernández M. Mantenimiento en el laboratorio del pez cebra (*Danio rerio*). [Trabajo de fin de grado]. Leioa: Universidad del País Vasco; 2013

Mourente G, Tocher DR, Diaz E, Grau A, Pastor E. Relationships between antioxidants, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in *Dentex dentex* eggs and larvae. *Aquaculture.* 1999; 179(1-4): 309-324

Mu X, Pang S, Sun X, Gao J, Chen J, Chen X, et al. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. *Environ Pollut.* 2013; 175: 147-157

Muramoto S. Vertebral column damage and decrease of calcium concentration in fish exposed experimentally to cadmium. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological.* 1981; 24(2): 125-133

Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development.* 1990; 109(2): 501-507

Neri-Cruz N, Elizalde-Velázquez A, Islas-Flores H, SanJuan-Reyes N, Galar-Martínez M, García-Medina S, et al. Pharmaceuticals and other pollutants as solid waste from hospitals and their toxic effects on aquatic organisms. In: *Environmental Science and Engineering, Volume 6 Toxicology.* USA: Studium Press LLC; 2017. p. 171–201

Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol.* 2007; 151(5): 580-590

Oliveira R, McDonough S, Ladewig JCL, Soares AMVM, Nogueira AJA, Domingues I. Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013; 36(3): 903-912

Organización Mundial de la Salud (OMS). Informe de la OMS sobre vigilancia del consumo de antibióticos 2016-2018. Suiza: Organización Mundial de la Salud; 2018. p. 127

Orozco-Hernández JM, Gómez-Oliván LM, Heredia-García G, Luja-Mondragón M, Islas-Flores H, SanJuan-Reyes N, et al. Genotoxic and cytotoxic alterations induced by environmentally-relevant concentrations of amoxicillin in blood cells of *Cyprinus carpio*. *Chemosphere*. 2019; 236: 124323

Ozolins TR & Hales BF. Tissue-specific regulation of glutathione homeostasis and the activator protein-1 (AP-1) response in the rat conceptus. *Biochem Pharmacol*. 1999; 57(10): 1165-1175

Ozolins TR, Hales BF. Oxidative stress regulates the expression and activity of transcription factor activator protein-1 in rat conceptus. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 280(2): 1085-1093

Park S & Choi K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*. 2008; 17(6): 526-538

Park S, Choi K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*. 2008; 17(6): 526-538

Pašková V, Hilscherová K, Bláha L. Teratogenicity and embryotoxicity in aquatic organisms after pesticide exposure and the role of oxidative stress. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2011; 211: 25-61

Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem*. 1991; 266(32): 22028-22034

Raloff J. Drugged waters: Does it matter that pharmaceuticals are turning up in water supplies? *Science News*. 1998; 153(12): 187-189

Regoli F, Nigro M, Benedetti M, Fattorini D, Gorbi S. Antioxidant efficiency in early life stages of the Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. *Aquat Toxicol.* 2005; 75(1): 43-52

Reimers MJ, Flockton AR, Tanguay RL. Ethanol- and acetaldehyde-mediated developmental toxicity in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology.* 2004; 26(6): 769-781

Santos LHMLM, Araujo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro MCBSM. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater.* 2010; 175(1-3): 45-95

Sass P, Brotz-Oesterhelt H. Bacterial cell division as a target for new antibiotics. *Curr Opin Microbiol.* 2013; 16(5): 522-530

Schlisser AE, Yan J, Hales BF. Teratogen-induced oxidative stress targets glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the organogenesis stage mouse embryo. *Toxicol Sci.* 2010; 118(2): 686-695

Shi XJ, Zhou B. The role of Nrf2 and MAPK pathways in PFOS-induced oxidative stress in zebrafish embryos. *Toxicol Sci.* 2010; 115(2): 391-400

Sinthuchai D, Boontanon SK, Boontanon N, Polprasert C. Evaluation of removal efficiency of human antibiotics in wastewater treatment plants in Bangkok, Thailand. *Water Sci Technol.* 2016; 73(1): 182-191

Sogorb MA, Pamies D, de Lapuente J, Estevan C, Estévez J, Vilanova E. An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using *in vitro* alternative methods. *Toxicology Letters.* 2014; 230(2): 356-367

Song C, Gao N-Y, Gao H-W. Transmembrane distribution of kanamycin and chloramphenicol: insights into the cytotoxicity of antibacterial drugs. *Mol BioSyst.* 2010; 6(10): 1901-1910

Straub JO, Gysel D, Kastl U, Klemmer J, Sonderegger M, Studer M. Environmental risk assessment for ancillary substances in biotechnological production of pharmaceuticals. *Environ Toxicol Chem.* 2012; 31: 681-687

Suárez C & Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2009; 27(2): 116-129

Theodorakis CW, Swartz CD, Rogers WJ, Bickham JW, Donnelly KC, Adams SM. Relationship between genotoxicity, mutagenicity, and fish community structure in a contaminated stream. *J Aquatic Ecosyst Stress Recovery.* 2010; 7: 131-143

Tilton F, La Du JK, Tanguay RL. Sulfhydryl systems are a critical factor in the zebrafish developmental toxicity of the dithiocarbamate sodium metam (NaM). *Aquat Toxicol.* 2008; 90(2): 121-127

Toyokuni S & Sagripanti JL. Iron-mediated DNA damage: sensitive detection of DNA strand breakage catalyzed by iron. *J Inorg Biochem.* 1992; 47(3-4): 241-248

Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2006; 64(2): 178-189

Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis.* 2014; 14(8): 742-750

van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2003; 13(2): 57-149

van Eijk E, Wittekoek B, Kuijper EJ, Smits WK. DNA replication proteins as potential targets for antimicrobials in drug-resistant bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72(5): 1275-1284

Von Westernhagen H. 4 sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. *Fish Physiology*. 1988; 11: 253-346

Wang H, Che B, Duan A, Mao J, Dahlgren RA, Zhang M, et al. Toxicity evaluation of β -diketone antibiotics on the development of embryo-larval zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol*. 2013; 29(10): 1134-1146

Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril*. 2002; 78(6): 1272-1277

Watkinson AJ, Murby EJ, Costanzo SD. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Res*. 2007; 41(18): 4164-4176

Watkinson AJ, Murby EJ, Kolpin DW, Costanzo SD. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. *Sci Total Environ*. 2009; 407(8): 2711-2723

Weigt S, Huebler N, Strecker R, Braunbeck T, Broschard TH. Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology*. 2011; 281(1-3): 25-36

Weinberg JM, Bienholz A, Venkatachalam MA. The role of glycine in regulated cell death. *Cell Mol Life Sci.* 2016; 73(11-12): 2285-2308

Wells PG, Bhuller Y, Chen CS, Jeng W, Kasapinovic S, Kennedy JC, et al. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 207(2 Suppl): 354-366

Wells PG, Kim PM, Laposa RR, Nicol CJ, Parmana T, Winn LM. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mut Res.* 1997; 396(1-2): 65-78

Winston GW, Lemaire DGE, Lee RF. Antioxidants and total oxyradical scavenging capacity during grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryogenesis. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2004; 139(4): 281-288

Yamagani K. Mechanisms of hatching in fish. In: *Fish physiology, Volume XIA*. New York: Academic Press; 1988. p. 447-499

Yumnamcha T, Roy D, Devi MD, Nongthomba U. Evaluation of developmental toxicity and apoptotic induction of the aqueous extract of *Millettia pachycarpa* using zebrafish as model organism. *Toxicol Environ Chem.* 2015; 97(10): 1363-1381

Zhang R, Tang J, Li J, Zheng Q, Liu D, Chen Y, et al. Antibiotics in the offshore waters of the Bohai Sea and the Yellow Sea in China: occurrence, distribution and ecological risks. *Environ Pollut.* 2013; 174: 71-77

Zheng Q, Zhang R, Wang Y, Pan X, Tang J, Zhang G. Occurrence and distribution of antibiotics in the Beibu Gulf, China: impacts of river discharge and aquaculture activities. *Mar Environ Res.* 2012; 78: 26-33

Zuccato C, Liber D, Ramos C, Tarditi A, Rigamonti D, Tartari M, et al. Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery. *Pharmacol Res.* 2005; 52(2): 133-139

Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Melis M, Fanelli R. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *J Hazard Mater.* 2010; 179(1-3): 1042-1048

CONTRIBUCIONES SELECTAS EN ECOTOXICOLOGÍA Y QUÍMICA AMBIENTAL

Tomo 1



Editado por:
Leobardo Manuel Gómez Oliván
Hariz Islas Flores
Patricia Ramírez Romero
Marcela Galar Martínez
Juan Carlos Sánchez Meza
Xochitl Guzmán García
Guadalupe Barrera Escorcía
José Luis Zavala Aguirre
Eloy Gasca Pérez
Octavio Dublán García

CONTRIBUCIONES SELECTAS EN ECOTOXICOLOGÍA Y QUÍMICA AMBIENTAL

Editado por:

Leobardo Manuel Gómez Oliván

Hariz Islas Flores

Patricia Ramírez Romero

Marcela Galar Martínez

Juan Carlos Sánchez Meza

Xochitl Guzmán García

Guadalupe Barrera Escorcía

José Luíz Zavala Aguirre

Eloy Gasca Pérez

Octavio Dublán García



AMEQA

PRÓLOGO

La Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental (AMEQA) es una asociación civil sin fines de lucro, fundada el 30 de abril de 2003. A partir de 2005 se incorporó a The Society of Environmental Toxicology and Chemistry como un capítulo regional de la denominada unidad geográfica Norteamérica, la cual abarca Canadá, Estados Unidos y México. El objetivo principal de AMEQA es crear y difundir el conocimiento, así como promover la investigación en ecotoxicología y química ambiental. La AMEQA ha organizado 8 congresos, una reunión internacional y un encuentro estudiantil con la finalidad de incentivar actividades académicas, técnicas y científicas. Como parte de la difusión de los resultados de investigación que se han presentado en estos eventos la AMEQA ha publicado dos libros. En 2018, se organizó el VIII congreso de la asociación teniendo como sede el Centro Conjunto de Investigación y Química Sustentable UAEM-UNAM en Toluca, Estado de México. En este evento se lanzó la convocatoria para escribir el tercer libro promovido por la asociación que dio como resultado el libro que hoy presentamos ***“Contribuciones Selectas en Ecotoxicología y Química Ambiental”***, siendo el primero que es formalmente editado por la asociación. El libro cuenta con 2 tomos, los cuales tienen 15 capítulos cada uno, escritos por estudiantes e investigadores de diversas

instituciones de educación superior e investigación de todo el país, con temas íntimamente ligados a la ecotoxicología y química ambiental.

Agradecemos a todos los revisores de capítulos de diferentes instituciones de educación superior de todo el país, sus esfuerzos que favorecieron el mejoramiento de la calidad de la presente obra.

Ahora corresponde al lector hacer los comentarios finales sobre esta edición, esperando contribuir de forma activa en la generación y aplicación del conocimiento en el área de la ecotoxicología y química ambiental con aportaciones de interés para el desarrollo de la investigación y educación de estas áreas, en el país y mesoamérica.

Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván
Presidente AMEQA 2020-2022

ÍNDICE

Foto de Portada por Leopoldo I. Flores. 2020.

	Página
Prólogo	3
Índice	4
Capítulo 1. EFECTO DE LAS PRECIPITACIONES ATÍPICAS EN EL CONTENIDO DE NITRÓGENO EN <i>Thalassia testudinum</i> . Dilian Anguas-Cabrera, Karla Camacho-Cruz, Ma. Concepción Ortiz-Hernández, Alberto Sánchez.	5
Capítulo 2. ACUMULACIÓN DE FÓSFORO EN SEDIMENTOS DE LA ZONA LITORAL DEL LAGO TOCHAC, HIDALGO, MÉXICO. Agustín de Jesús Quiroz Flores, María Guadalupe Miranda Arce.	24
Capítulo 3. RESPUESTAS DE LOS OCTOCORALES ANTE LA EUTROFIZACIÓN DE LAS ZONAS MARINO-COSTERAS: REVISIÓN Y SÍNTESIS. Néstor Rey-Villiers, Alberto Sánchez, Patricia González-Díaz.	37
Capítulo 4. OCURRENCIA, DESTINO, DETECCIÓN Y EFECTOS TÓXICOS DE ANTIBIÓTICOS EN AMBIENTES ACUÁTICOS. Edgar David González-González, Leobardo Manuel Gómez-Oliván, Marcela Galar-Martínez, Hariz Islas-Flores, María Dolores Hernández-Navarro.	65
Capítulo 5. IMPACTO ECOTOXICOLÓGICO DEL 17 α -ETINILESTRADIOL (EE2) EN AMBIENTES ACUÁTICOS. Alejandro Mejía-García, Leobardo Manuel Gómez Oliván.	93
Capítulo 6. DESTINO, OCURRENCIA Y EFECTOS TÓXICOS DE EDULCORANTES ARTIFICIALES, UN NUEVO TIPO DE CONTAMINANTES EMERGENTES. Livier Mireya Sánchez Aceves, Leobardo Manuel Gómez-Oliván, Hariz Islas-Flores, Marcela Galar-Martínez.	122
Capítulo 7. PLAGUICIDAS Y CÁNCER EN BAJA CALIFORNIA: REVISIÓN SISTEMÁTICA (1950-2016). María Evarista Arellano García , Olivia Torres Bugarín, Marco Antonio García Zárate, Ana Erika Ruiz Arellano .	158
Capítulo 8. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE CONTAMINANTES AMBIENTALES MEDIANTE EL ENSAYO FETAX. Itzayana Pérez-Alvarez, Hariz Islas-Flores, Leobardo Manuel Gomez-Oliván, Germán Chamorro Cevallos.	182
Capítulo 9. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CYP1A EN PECES PLANOS EN EL SURESTE DEL GOLFO DE MÉXICO. Wendy Donaji Nicolás-González, Isajav Rivas-Reyes, Mayra Alejandra Cañizares-Martínez, Mercedes Quintanilla-Mena, Victoria Patiño-Suárez, Marcela Del Río-García, Omar Zapata-Pérez, Carlos Puch-Hau.	213
Capítulo 10. CAMBIOS EPIGENÉTICOS POSIBLEMENTE ASOCIADOS CON LA PRESENCIA DE CONTAMINANTES EN PECES DEL NOROESTE DEL GOLFO DE MÉXICO: NIVELES DE METILACIÓN GLOBAL DEL ADN. Mercedes Quintanilla-Mena, Isajav Rivas-Reyes, Alejandra Cañizares-Martínez,	237

Victoria Patiño-Suárez, Marcela Del Río-García, Carlos Puch-Hau.	
Capítulo 11. GENES BIOMARCADORES DE CONTAMINANTES: UNA VISIÓN DESDE EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA MOLECULAR, CINVESTAV, MÉRIDA, MÉXICO. María Victoria Patiño-Suárez, Mayra Alejandra Cañizares-Martínez, Mercedes Quintanilla-Mena, Marcela Del Río-García, Isajav Rivas-Reyes, Omar Zapata-Pérez, Carlos Puch-Hau.	263
Capítulo 12. LA CONTAMINACIÓN DE SUELOS POR HIDROCARBUROS EN MÉXICO: EFECTOS EN EL AMBIENTE Y LA SALUD HUMANA. Alejandro Islas-García, Arely Vergara-Castañeda, Laura Martino-Roaro, Adriana Benitez Rico, Tomás Chávez-Miyauchi.	292
Capítulo 13. BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS DE LA LAGUNA DE SAN JUAN, ASCENSIÓN, CHIHUAHUA Y SU EVALUACIÓN EN PLANTAS DE <i>Solanum lycopersicum</i>. Marisela Yadira Soto-Padilla, Jorge Deciderio Carrillo-Méndez, Edith Flores-Tavizón, Luis Gerardo Bernadac-Villegas, Sergio Saúl-Solís, Miguel Domínguez-Acosta, Felipe Adrián Vázquez Galvez.	317
Capítulo 14. ESTADO ACTUAL DE LA CONTAMINACIÓN COSTERA DE LATINOAMÉRICA POR COMPUESTOS ORGÁNICOS DE ESTAÑO. Russell Giovanni Uc Peraza , Victor Hugo Delgado-Blas ,Gilberto Fillmann.	344
Capítulo 15. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA BIOLÓGICA DE FILTROS A BASE DE ARCILLA UTILIZADOS EN LA REMOCIÓN DE ARSÉNICO EN AGUA. Luis Bernadac-Villegas, Alba Corral-Avitia, Leobardo Gómez-Oliván, Dora Solís-Casados, Marisela Soto-Padilla.	373

Capítulo 4

OCURRENCIA, DESTINO, DETECCIÓN Y EFECTOS TÓXICOS DE ANTIBIÓTICOS EN AMBIENTES ACUÁTICOS

Edgar David González-González^{1*}

Leobardo Manuel Gómez-Oliván¹

Marcela Galar-Martínez²

Hariz Islas-Flores¹

María Dolores Hernández-Navarro¹

¹ Laboratorio de Toxicología Ambiental, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón intersección Paseo Tolloca s/n, Col. Residencial Colón, C.P. 50120, Toluca, Estado de México, México.

² Laboratorio de Toxicología Acuática. Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás, C.P. 11340, Ciudad de México, México

* ed.gonzalezg@hotmail.com

Resumen

Los antibióticos son un grupo importante de productos farmacéuticos en la medicina actual. Además de utilizarse en el tratamiento de infecciones humanas, también se usan en medicina veterinaria. Los residuos de antibióticos representan un grave problema medioambiental por su consumo excesivo e introducción continua. La presencia de antibióticos y sus metabolitos en los ecosistemas acuáticos, en concentraciones que van desde ng/L hasta mg/L, afecta a los hidrobiontes. Los efectos ecotoxicológicos varían en función del tipo de fármaco, la sensibilidad de las especies, la concentración del tóxico y el tiempo de exposición. Estos efectos los producen los residuos de antibióticos, los metabolitos formados y/o los productos de degradación que, en algunas ocasiones, generan sustancias más tóxicas que el compuesto original. Este trabajo revisa y recopila la información sobre los principales ensayos de ecotoxicidad de los antibióticos, considerando las diferentes vías de entrada en el ambiente acuático, su destino y la toxicidad que producen en las especies más relevantes de los ecosistemas acuáticos.

Palabras clave: antibióticos, ecotoxicidad, ambientes acuáticos

1. Antibióticos

Se denomina antibiótico a cualquier sustancia química producida por un microorganismo, utilizada para eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos infecciosos. Una propiedad común de todos los antibióticos es la toxicidad selectiva; presentan una toxicidad hacia los organismos invasores superior a la que muestran frente a animales o seres humanos. En un principio, el término antibiótico sólo se empleaba para referirse a los compuestos orgánicos de origen biológico, los cuales se obtienen de cultivos de bacterias u hongos, que resultan tóxicos para otros microorganismos. En la actualidad también se emplea para denominar compuestos sintéticos, los producidos exclusivamente por síntesis química, o semisintéticos, cuando a partir de un núcleo básico del antibiótico producido por el microorganismo, se modifican algunas de sus características químicas para mejorar sus propiedades farmacocinéticas o su espectro o, incluso, para disminuir su toxicidad (Lorenzo et al., 2008).

Su clasificación puede realizarse con base a diferentes criterios. Según la presencia de grupos químicos particulares se dividen en (Mestres & Duran, 2012):

b-lactámicos

Son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica ya que presentan características favorables, tales como: una buena absorción oral, buena difusión, escasos efectos adversos, así como el amplio y diferente espectro de acción alcanzado por los diversos fármacos. Forman parte de este grupo: a) penicilinas: destacan aquellas que son naturales, como penicilina G, aquellas con actividad antiestafilocócica como cloxacilina, las de espectro amplio como amoxicilina o ampicilina, o las antipseudomonas como piperacilina y b) cefalosporinas: las cuatro generaciones diferentes que existen se diferencian en el espectro antibacteriano. De 1ª generación destacan cefalexina, cefalotina o cefadroxilo; de 2ª generación: cefuroxima o cefoxitina; de 3ª generación: cefotaxima, ceftriaxona, cefixima o ceftazidima y de 4ª generación: cefepima. Inhiben la síntesis de la pared bacteriana y promueven la activación de enzimas autolíticas que producen la lisis de la bacteria (Seija & Vignoli, 2016).

Aminoglucósidos

Este grupo de antibióticos contienen dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol. Se unen de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, interfiriendo la lectura correcta del código genético con el consiguiente bloqueo de la síntesis proteica de la bacteria. Forman parte de este grupo: estreptomina, neomicina, gentamicina, amikacina, kanamicina, tobramicina y netilmicina. Actúan inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas. Son antibióticos que no se absorben por vía oral por lo que se administran vía intravenosa o intramuscular. Son antibióticos muy activos contra bacilos gramnegativos y generalmente se suelen asociar a otro antibiótico. Las reacciones adversas más importantes son: ototoxicidad y nefrotoxicidad (Seija & Vignoli, 2016).

Macrólidos

Se caracterizan por tener como núcleo un anillo macrocíclico de lactona multimembrado al cual se unen desoxiazúcares aminados. Se unen a la subunidad 50S del ARN ribosómico en forma reversible. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido y determinadas bases del ARNr. Esto provoca un bloqueo en las reacciones de transpeptidación y traslocación. Forman parte de este grupo: eritromicina, claritromicina, azitromicina y espiramicina. Actúan por inhibición de la síntesis de proteínas. Se pueden administrar por vía oral o parenteral para tratar infecciones por bacterias poco sensibles a otros antibióticos. Entre los efectos adversos más frecuentes se encuentra el dolor abdominal, principalmente por eritromicina, debido a su efecto sobre la motilidad gastrointestinal, así como hepatotoxicidad (Lucas et al., 2007).

Quinolonas

Las quinolonas de uso clínico tienen una estructura formada por dos anillos, con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo en la posición 3. La potencia y espectro aumenta cuando lleva un átomo de flúor normalmente en la posición 6, dando lugar a las fluoroquinolonas. Las quinolonas son antibióticos bactericidas y actúan inhibiendo la ADN girasa, enzima que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico, que asegura una adecuada división celular. Forman parte de este grupo: norfloxacin, ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino. Actúan inhibiendo la síntesis de ADN bacteriano. Existen formas de administración por vía parenteral o vía oral. Tienen un espectro de acción amplio y variado, así norfloxacin y ciprofloxacino presentan actividad especialmente frente a gramnegativos. Otros como levofloxacino y moxifloxacino presentan un espectro más amplio cubriendo incluso *Streptococcus*, *Moraxella* o *Haemophilus* sp. Son antibióticos bien tolerados y con baja incidencia de efectos adversos, destacando como más grave la toxicidad articular (a nivel de cartílago) (Alós, 2009).

Tetraciclinas

Estos compuestos se derivan de las sustituciones de 4 anillos en el núcleo hidronaftaceno, son derivados análogos de la naftaceno-carboxaneda policíclica. Actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S de las bacterias. Forman parte de este grupo: tetraciclina, clortetraciclina, minociclina, doxiciclina, oxitetraciclina y tigeciclina. Actúan inhibiendo la síntesis de proteínas. Presentan un amplio espectro antibacteriano (gramnegativos, grampositivos, y otras bacterias poco frecuentes) (Vicente & Pérez-Trallero, 2010).

Sulfonamidas

Su estructura química contiene azufre, oxígeno y nitrógeno que forman el núcleo de la molécula de las sulfamidas. Su estructura es similar al ácido paraaminobenzoico, un factor requerido por las bacterias para la síntesis del ácido fólico. Forman parte de este grupo: sulfametoxazol, sulfasalazina, sulfadiazina. Actúan inhibiendo la síntesis de ácido fólico necesario para la replicación del ADN. Relacionado con el grupo está el trimetoprim que también inhibe esta síntesis, aunque en un paso diferente. Generalmente se suelen utilizar asociados. Poseen un amplio espectro de acción si bien se suelen utilizar para el tratamiento de *Nocardia* sp, la enfermedad inflamatoria intestinal (sulfasalazina), quemaduras y úlceras (sulfadiazina) o en la profilaxis de neumonía por *Pneumocystis carinii* en pacientes inmunodeprimidos (Vicente & Pérez-Trallero, 2010).

1.2. Uso y consumo de antibióticos

Los patrones de uso pueden ser distintos en diferentes países (Kümmerer, 2009b). Wise (2002) estima que el consumo de antibióticos en todo el mundo se encuentra entre 100,000 y 200,000 toneladas por año. El consumo humano total, per cápita y la proporción individual de cada compuesto, así como las tasas de prescripción de antibióticos y la ingesta sin receta varían notablemente entre países (Mölstad et al., 2002).

Los antibióticos β -lactámicos, incluidos los subgrupos de penicilinas, cefalosporinas y, como fracciones marginales, carbapenémicos y otros, constituyen la mayor parte de los antibióticos de uso humano en la mayoría de los países. Representan aproximadamente el 50-70% del uso total de antibióticos. En la mayoría de los países, las sulfonamidas, los macrólidos y las fluoroquinolonas siguen un orden decreciente de uso (Goossens et al., 2005; Kümmerer, 2003).

Si los antibióticos se venden en el mostrador, es decir, sin receta, el consumo podría ser aún mayor. De acuerdo con las diferentes legislaciones y los diferentes grados de importancia atribuidos al uso de antibióticos, existen datos

confiables que brindan información sobre el uso total y los patrones de uso de antibióticos y el consumo per cápita para solo unos pocos países (Kümmerer, 2003).

Debido a que los datos internacionales se basan únicamente en estimaciones, se desconoce el verdadero volumen de uso de antimicrobianos en el sector agroalimentario. Las cantidades de antibióticos utilizadas están sujetas a confusión; para la mayoría de los países no hay datos o sólo se dispone de valores aproximados (Kümmerer, 2009b).

Existen reportes de la contribución de la agricultura, el ganado y, en general, de los animales destinados al consumo, en la contaminación por antibióticos en el ambiente (estos compuestos son administrados en grandes cantidades a dichos animales para promover su crecimiento), provocando una preocupación creciente en todo el mundo, debido al hecho de que tales antibióticos pertenecen a la misma clase de los utilizados en los seres humanos (como tetraciclinas y aminoglucósidos). En respuesta a este problema, la Unión Europea ha prohibido el uso de antibióticos como aditivos en forrajes para estimular el crecimiento de estos animales, ya que existe evidencia de resistencia cruzada a los agentes antimicrobianos utilizados en tratamientos en humanos (Cromwell, 2002; Gaskins et al., 2002; Heuer et al., 2006).

Los antibióticos son utilizados de diversas formas en medicina veterinaria. Lo que surge como obvio es su utilización en forma terapéutica, para el tratamiento de determinadas enfermedades infecciosas, de la misma manera que en la medicina humana. Sin embargo, existen otras formas de utilización: La metafilaxia es una forma de uso que implica el control de ciertas variables clínicas de grupos de animales, hasta que una de ellas, la temperatura, por ejemplo, aumenta por encima de determinado valor límite, fijado de antemano. En este caso, todo el lote de animales es tratado para evitar un brote de la enfermedad. La profilaxia, por su parte, implica la utilización de medicamentos para la prevención de enfermedad en animales individuales o grupos de ellos. Finalmente, el uso de antimicrobianos a concentraciones subterapéuticas, se puede utilizar con objetivos profilácticos y/o de promoción del crecimiento (Errecalde, 2004).

Algunos compuestos pueden emplearse para fines distintos a la medicina humana o veterinaria: los antibióticos, como las estreptomycinas, se usan en el cultivo de frutas, mientras que otros se utilizan en la apicultura (Kümmerer, 2009a).

Los antibióticos se han usado desde la década de 1950 para controlar ciertas enfermedades bacterianas de frutas, vegetales y plantas ornamentales de alto valor. Hoy en día, los antibióticos más comúnmente usados en las plantas son la estreptomycinina y, en menor medida, la oxitetraciclina. Los usos principales son en

cultivo de manzanas, peras y árboles ornamentales para el control de la niebla del peral y del manzano causados por *Erwinia amylovora* (Mcmanus et al., 2002).

Para ser un candidato viable para el control de la enfermedad, el antibiótico debe estar activo en la planta o dentro de ella, y tolerar la oxidación, la radiación UV, la lluvia y las altas temperaturas. Estas propiedades son exactamente las que causan problemas en el ambiente. Sin embargo, faltan datos sobre las concentraciones de estreptomina en el suelo para el cultivo de la fruta. Nuevamente, debido a las diferentes regulaciones, la situación es distinta en diferentes países (Kümmerer, 2009a).

Otra fuente potencial de antibióticos contaminantes en el ambiente es la acuicultura que, de manera similar a la industria ganadera, utiliza antibióticos para promover el stock de peces saludables (Pruden et al., 2013).

La definición actual de acuicultura, según la FAO, es “el cultivo de organismos acuáticos, incluidos peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas”. El cultivo implica algún tipo de intervención durante el proceso para aumentar la producción. En acuicultura, los antibióticos se han utilizado principalmente con fines terapéuticos y como agentes profilácticos (Hernández-Serrano, 2005).

1.3. Ocurrencia y destino de antibióticos en ambientes acuáticos

Durante las últimas décadas, la presencia de antibióticos en el medio acuático ha despertado una preocupación cada vez mayor en todo el mundo. Los antibióticos, utilizados con mayor frecuencia en medicina humana y veterinaria, pueden tomar varias rutas hacia el ambiente (ver Figura 1). Los antibióticos consumidos se descargan continuamente en los ecosistemas naturales a través de la excreción (orina y heces) después de un corto período de residencia en los organismos humanos y animales. Estos medicamentos pueden llegar al ambiente acuático mediante descargas directas de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) al agua superficial o subterránea, lixiviados, alcantarillas y tanques de almacenamiento de estiércol o lagunas, escorrentías y lixiviación de tierras agrícolas fertilizadas con estiércol, o por disposición de aguas residuales en áreas agrícolas, entre otras descargas (Heberer, 2002; Kemper, 2008; Li et al., 2014).

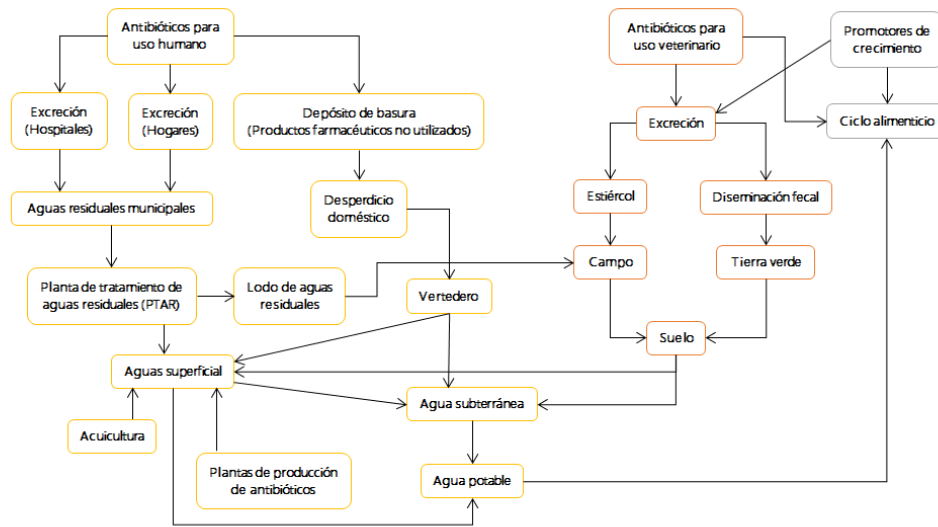


Figura 1. Fuentes y vías para la presencia de antibióticos en el ambiente.
Fuente: (Milić et al., 2013)

La presencia en el ambiente de antibióticos utilizados en medicina humana se atribuye principalmente a la descarga de aguas residuales tratadas (en PTAR) y no tratadas, debido a que los procesos convencionales de tratamiento no eliminan eficazmente estos compuestos (Homem & Santos, 2011; Watkinson et al., 2007).

La práctica de la aplicación de estiércol en la tierra con fines de fertilización del suelo es la mayor contribución de la medicina veterinaria para la contaminación del ambiente por antibióticos. Una vez en el suelo, estos compuestos pueden ingresar al medio acuático indirectamente a través de la escorrentía superficial hacia las aguas superficiales y/o lixiviarse a las aguas subterráneas y al agua potable (Blackwell et al., 2009; Chee-Sanford et al., 2009; Sarmah et al., 2006).

Una vía alternativa de aportes al medio acuático se deriva de la aplicación de antibióticos para la acuicultura. Se espera que los derrames o las descargas derivadas de incidentes durante la fabricación, la eliminación de los medicamentos y contenedores no utilizados, y la dispersión atmosférica de polvo de piensos y estiércol que contienen antibióticos sean mínimos (Gothwal & Shashidhar, 2015).

Los antibióticos experimentan un cambio estructural en el organismo humano y animal antes de su excreción, lo cual genera metabolitos. Después de la excreción, ambos compuestos, principales y metabolitos, pueden sufrir modificaciones estructurales adicionales por procesos bióticos y abióticos en instalaciones técnicas, tales como PTAR y plantas de tratamiento de agua, y en el entorno natural, resultando en productos de transformación. Los subproductos

difieren en propiedades fisicoquímicas y farmacológicas en comparación con sus compuestos originales (Carvalho & Santos, 2016).

Los antibióticos y sus subproductos en el ambiente pueden persistir a través de un ciclo de transformación parcial, bioacumulación y deposición gradual en el suelo, el agua superficial y el agua subterránea. El ciclo de vida de estos compuestos se rige por una serie de procesos biológicos y fisicoquímicos en los sistemas suelo-agua, particularmente estabilidad, sorción, lixiviación y degradación, los cuales dependen de las propiedades fisicoquímicas de los antibióticos, las propiedades del suelo, y las condiciones climáticas (Manzetti & Ghisi, 2014; Zhao et al., 2015).

Los antibióticos y sus subproductos en ambientes acuáticos pueden ser absorbidos por animales (animales productores de alimentos y peces) o alcanzar el agua potable, lo que también induce posibles efectos a largo plazo en los seres humanos como parte continua de su dieta a través del agua o alimentos en bajas concentraciones (Manzetti & Ghisi, 2014; Thiele-Bruhn, 2003).

Todavía no hay evidencia científica sobre la absorción sistemática y la entrada de bajas dosis de antibióticos y su impacto en los humanos y el ambiente. Las matrices biótica y abiótica del ambiente se encuentran en un equilibrio dinámico frágil y la presencia de contaminantes emergentes, que son tóxicos, peligrosos, potencialmente mutagénicos y carcinogénicos, afectan poderosamente el estado del ambiente y la salud humana (Vojinović-Miloradov et al., 2011a; Vojinović-Miloradov et al., 2011b).

En contraste con la expectativa general, los hospitales no son la principal fuente de productos farmacéuticos en las aguas residuales municipales (Kümmerer, 2009b; Schuster et al., 2008). Son la principal fuente de antibióticos sólo para el grupo de las cefalosporinas.

En cuanto al metabolismo de los compuestos activos en humanos, existe un amplio intervalo en el grado en que estos se biotransforman. Algunos agentes se metabolizan en un 90% o más, mientras que otros lo hacen sólo en un 10%, o incluso menos. (Kümmerer, 2003; Lorian, 2005).

Se ha encontrado que las concentraciones de antibióticos medidas en diferentes países se encuentran en el mismo intervalo de concentraciones en los diferentes compartimentos, como aguas residuales y aguas superficiales, respectivamente (Batt & Aga, 2005; Botitsi et al., 2007; Chang et al., 2008; Duong et al., 2008; Hernández et al., 2007; Martins et al., 2008; Peng et al., 2008).

En general, las concentraciones se encuentran en mg por litro en el efluente hospitalario; en μg por litro, en las aguas residuales municipales y en diferentes aguas superficiales, subterráneas y agua de mar (Xu et al., 2007).

Los antibióticos humanos y veterinarios están presentes en los sedimentos. Kim & Carlson (2007) detectaron tetraciclinas, sulfonamidas y macrólidos. La concentración de sedimento medida en un río influenciado por la agricultura fue mucho más alta que en la matriz de agua suprayacente, lo que indica la entrada de antibióticos con la escorrentía superficial de los campos agrícolas. En la acuicultura intensiva, las infecciones se tratan mediante la adición de agentes antimicrobianos al agua. Los fármacos empleados pueden ingresar a los sedimentos directamente desde el agua sin someterse a ningún tipo de proceso de purificación. Esto resulta en altas concentraciones locales en el compartimento de agua y en los sedimentos adyacentes. Este fenómeno ya había sido investigado hace más de 20 años, y los resultados habían demostrado la presencia de antibióticos aplicados extensamente en la acuicultura en sedimentos debajo de granjas de peces (Björklund et al., 1990; Coyne et al., 1994; Jacobsen & Berglind, 1988; Migliore et al., 1993).

Las penicilinas forman una de las familias más importantes de antibióticos usados en medicina veterinaria y humana. Su presencia en las muestras ambientales es baja debido a su rápida transformación en el ambiente (hidrólisis relativamente fácil del anillo β -lactámico). A pesar del amplio uso de estos compuestos, algunos investigadores informan la ausencia de residuos de penicilina en muestras de agua, probablemente debido a la falta de métodos sofisticados y equipos analíticos (Christian et al., 2003).

Los macrólidos se eliminan principalmente después de la administración en una forma inalterada. Algunos de estos (como la claritromicina y la deshidroeritromicina), y las sulfonamidas (como el sulfametoxazol, la sulfadimetoxina, la sulfametazina y el sulfatiazol) son los antibióticos más prevalentes detectados en el ambiente acuático en concentraciones de $\mu\text{g/L}$ (Halling-Sørensen et al., 1998; Hirsch et al., 1999).

Las sulfonamidas son antibióticos ampliamente utilizados en la cría de animales como aditivos para piensos. No se metabolizan por completo en el hígado y los riñones y se excretan en forma inalterada y como metabolitos. El sulfametoxazol es la sulfonamida más detectada en las aguas residuales y sus concentraciones varían según el proceso aplicado de tratamiento de aguas residuales y el consumo de antibióticos (Le-Minh et al., 2010; Tong et al., 2009).

Las fluoroquinolonas se han usado principalmente en medicina humana, pero más recientemente el enrofloxacin, la sarafloxacin y el ciprofloxacino también se han aplicado en medicina veterinaria, convirtiéndose en una gran preocupación debido a su amplio espectro de influencia y la posible resistencia bacteriana (Angulo et al., 2004; Karthikeyan & Meyer, 2006).

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro con actividad contra las bacterias grampositivas y gramnegativas que se usan ampliamente para el tratamiento de las enfermedades infecciosas en medicina veterinaria y humana, así como aditivos en los alimentos para animales. Las tetraciclinas son uno de los grupos de antibióticos más prevalentes en las aguas residuales. Por lo general, no se detectan a niveles elevados en el medio acuático, puesto que precipitan con cationes como el calcio y se acumulan en los lodos o sedimentos de las aguas residuales (Halling-Sørensen et al., 1998; Kolpin et al., 2002).

1.4. Detección de antibióticos en ambientes acuáticos

En los últimos años, la creciente preocupación sobre la aparición de contaminantes emergentes, como los antibióticos, en diferentes matrices ambientales ha dado lugar a un enorme progreso en el desarrollo de técnicas para la detección de trazas de estos compuestos. Los nuevos métodos analíticos son cruciales para la evaluación de su impacto ambiental y su efecto en la salud humana a través de planes de monitoreo, que requieren datos precisos y confiables (Buchberger, 2011).

Los antibióticos incluyen un amplio grupo de sustancias químicas caracterizadas por diferentes propiedades fisicoquímicas. Los contaminantes considerados pseudopersistentes, los antibióticos y sus subproductos se han detectado en el ambiente en baja concentración (ng/L) (Seifrtová et al., 2009). El análisis de antibióticos en matrices ambientales acuosas generalmente se lleva a cabo por cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masas en tándem (LC-MS/MS) después de la limpieza de la muestra y la preconcentración de los analitos por extracción en fase sólida (SPE) (Buchberger, 2007).

Dado que las matrices de muestras ambientales son complejas y a menudo contienen elementos interferentes, que pueden enmascarar los compuestos de interés, el análisis directo puede no ser posible (Pavlović et al., 2007). Por lo tanto, las técnicas de limpieza y extracción, permiten obtener extractos con precisión para el análisis sensible, siendo estos procedimientos importantes previos al análisis (Kostopoulou & Nikolaou, 2008).

La detección de antibióticos en el medio acuático presenta un verdadero desafío analítico debido a sus bajas concentraciones (ppb, ppt o inferior), sus diversas propiedades fisicoquímicas y biomatrices complejas. Hoy en día, debido al gran progreso en la química analítica instrumental, es posible detectar varios tipos de antibióticos en concentraciones de $\mu\text{g/L}$ a ng/L usando la cromatografía líquida (LC, *Liquid Chromatography*) y la cromatografía de gases (GC, *Gas Chromatography*) junto con la espectrometría de masas (MS, *Mass Spectrometry*), espectrometría infrarroja o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High*

Performance Liquid Chromatography) acoplada a ultravioleta (UV, *Ultraviolet*), arreglo de diodos (DA, *Diode Array*) y fluorescencia (FL, *Fluorescence*) o MS después de la extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) de la matriz de agua (Samanidou et al., 2007).

Los antibióticos a menudo poseen núcleos no polares y grupos funcionales polares, por lo que se disocian o protonan dependiendo del pH del medio. Las fases muy polares y no polares pueden causar una extracción incompleta de antibióticos y presentar un problema analítico grave (Juhel-Gaugain et al., 2000). Diversos compuestos orgánicos pueden interferir significativamente con los resultados del análisis (Baquero et al., 2008; Petrović et al., 2003; Tong et al., 2009).

El desarrollo de los métodos de extracción simultánea en cartuchos de balance hidrófilo-lipófilo (HLB, *Hydrophilic-Lipophilic Balance*) presenta una mejora significativa en la extracción de diferentes antibióticos con menor tiempo y consumo de material (Pailler et al., 2009; Terzić et al., 2008).

Se pueden utilizar métodos inmunoquímicos, voltamperometría y detección amperométrica, cromatografía en capa fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*) y kits comerciales para monitorear los antibióticos en concentraciones más altas (ppb) en diferentes biomatrices (huesos, leche, carne, sangre, etc.), pero no en las muestras de agua. Sólo el radioinmunoensayo, como técnica inmunoquímica, muestra su eficacia para la detección de antibióticos en la matriz de agua. Los métodos LC-MS/MS han ganado popularidad y se han convertido en una de las técnicas favoritas para analizar productos farmacéuticos como antibióticos y productos de transformación de las reacciones que ocurren en el medio acuático, entre otros métodos analíticos (LC-UV/FL y GC-MS). La especificidad, la precisión, la estabilidad, la recuperación, la linealidad, la reproducibilidad, el límite de decisión y el límite de detección son algunos de los criterios de rendimiento que deben examinarse (Radjenović et al., 2007).

Los métodos analíticos basados en LC se han utilizado para la identificación y cuantificación sensible y selectiva de antibióticos como contaminantes ambientales. En la mayoría de los estudios la detección por MS se usa para identificar, cuantificar o confirmar inequívocamente el analito objetivo; este método que implica la ionización química a presión atmosférica (APCI, *Atmospheric Pressure Ionization*), así como la ionización por electropulverización (ESI, *Electrospray Ionization*), representan actualmente el estado del arte. El análisis cuantitativo de los analitos presentes en matrices simples, como el agua potable, puede realizarse utilizando cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masas (LC-MS). Sin embargo, en matrices complejas, como las aguas residuales, se requiere de LC-MS/MS para la cuantificación y la confirmación inequívoca de los compuestos. La LC-MS/MS adicional permite límites de detección en el rango de ng/L, lo que hace

que su aplicación en la detección de antibióticos presente en matrices ambientales sea muy común. Además, los detectores de masas más sofisticados que los de cuadrupolo simple; por ejemplo, de tiempo de vuelo (TOF, *Time of Flight*) o cuadrupolar se emplean con frecuencia en el análisis multirresiduo, ya que ofrecen mayor sensibilidad y selectividad (Pozo et al., 2006).

1.5. Efectos tóxicos de antibióticos en organismos acuáticos

Los antibióticos se usan especialmente para combatir bacterias patógenas. Sin embargo, en el ambiente los organismos no objetivo están inevitablemente expuestos a sus residuos y subproductos. Los productores primarios y los descomponedores, que son esenciales para el funcionamiento sostenible de los ecosistemas, pueden ser vulnerables a los antibióticos. En consecuencia, estos fármacos y sus subproductos pueden alterar los procesos vitales del ecosistema acuático. Estos potenciales efectos ecotoxicológicos son difíciles de predecir, especialmente en matrices complejas. La ecotoxicidad aguda o crónica de los antibióticos y sus subproductos se ha evaluado mediante ensayos de ecotoxicidad estándar en organismos de diferentes niveles tróficos, como bacterias, algas, invertebrados y peces (Carvalho & Santos, 2016).

Lanzky & Halting-Sørensen (1997) probaron la toxicidad aguda del metronidazol en organismos de agua dulce y marinos (las algas verdes *Chlorella* y *Selenastrum capricornutum*, el copépodo *Acartia tonsa* y el pez cebrá *Brachydanio rerio*). Las pruebas mostraron efecto sobre *Chlorella* y *S. capricornutum*, pero no se observó efecto letal agudo en los organismos acuáticos *A. tonsa* y *B. rerio*. Reportaron valores de concentración efectiva media (CE₅₀) para este fármaco de 12.5 mg/L y 40.4 mg/L sobre *Chlorella* y *S. capricornutum*, respectivamente. El estudio demostró el potencial ecotóxico del metronidazol.

Isidori et al. (2005) investigaron la ecotoxicidad de seis antibióticos (eritromicina, oxitetraciclina, sulfametoxazol, ofloxacina, lincomicina y claritromicina) en organismos acuáticos. Realizaron bioensayos sobre bacterias, algas, rotíferos, microcrustáceos y peces (*Vibrio fischeri*, *Brachionus calyciflorus*, *Thamnocephalus platyurus*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* y *Danio rerio*) para evaluar la toxicidad aguda y crónica. Los resultados ecotoxicológicos mostraron que la toxicidad aguda era del orden de mg/L, mientras que para los datos crónicos, los antibióticos eran bioactivos en concentraciones del orden de µg/L, principalmente para las algas. Los fármacos investigados fueron de uno o dos órdenes de magnitud menos activos contra los rotíferos y crustáceos. La ofloxacina fue el único compuesto genotóxico y el sulfametoxazol, la ofloxacina y la lincomicina fueron mutagénicos. En cuanto al riesgo ambiental, se descubrió que los macrólidos son los más dañinos para el ambiente acuático.

Park & Choi (2008) evaluaron once antibióticos de uso común (sulfonamidas, tetraciclinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y b-lactámicos), utilizando organismos de prueba estándar (*V. fischeri*, *D. magna*, *Moina macrocopa* y *Oryzias latipes*). Entre los antibióticos analizados en el ensayo agudo, la neomicina fue la más tóxica, seguida del trimetoprim, el sulfametoxazol y el enrofloxacin. La sulfametazina, la oxitetraciclina, la clortetraciclina, la sulfadimetoxina y el sulfatiazol tuvieron una toxicidad intermedia, mientras que la ampicilina y la amoxicilina fueron menos tóxicas para los organismos de prueba. En el ensayo crónico, la neomicina afectó la reproducción y la supervivencia adulta de *D. magna* y *M. macrocopa* con niveles bajos de exposición a mg/L. Ellos concluyeron que se requieren más estudios que incluyan monitoreo y estudios toxicológicos detallados para evaluar el riesgo ecológico potencial de estos antibióticos veterinarios de uso frecuente.

van der Grinten et al. (2010) compararon la sensibilidad de algas, cianobacterias y bioensayos bacterianos a diferentes clases de antibióticos en un intervalo de concentraciones de 0.1 mg/L a 10 mg/L. En este estudio, no se observaron efectos para ninguno de los compuestos de prueba. Para trimetoprim, sulfametoxazol y estreptomina, las cianobacterias eran más vulnerables que las algas verdes cuando se utilizaba la eficiencia fotosintética como punto final.

Li et al. (2014) encontraron que el difloxacin y el moxifloxacin exhibieron un notable efecto tóxico sobre la fotobacteria *V. fischeri* entre las 21 quinolonas analizadas, con un 20% de concentraciones inhibitorias para la eliminación de luminiscencia (CLL₂₀) de 19 y 23 $\mu\text{mol/L}$. Aunque las quinolonas mostraron una toxicidad aguda limitada para *V. fischeri*, se detectó una elevación de la toxicidad después de su cloración. Por lo tanto, el tratamiento de desinfección por cloración del agua que contiene quinolonas debería ser una preocupación.

Ebert et al. (2011) investigaron el efecto de inhibición del crecimiento por la presencia de fluoroquinolonas (enrofloxacin y ciprofloxacino) en cuatro especies acuáticas fotoautotróficas: la microalga de agua dulce *Desmodesmus subspicatus*, la cianobacteria *Anabaena flosaquae*, la macrófita monocotiledónea *Lemna minor* y la macrófita dicotiledónea *Myriophyllum spicatum*. Ambos antibióticos, que actúan inhibiendo la ADN girasa bacteriana, demostraron una alta toxicidad para *A. flosaquae* y *L. minor* y toxicidad moderada o leve para *D. subspicatus* y *M. spicatum*. La cianobacteria fue la especie más sensible con valores de CE₅₀ de 173 y 10.2 mg/L para enrofloxacin y ciprofloxacino, respectivamente.

Rico et al. (2014) evaluaron el impacto ecológico del enrofloxacin en la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas de agua dulce tropicales. La fluoroquinolona se aplicó a concentraciones ambientalmente relevantes (1, 10, 100 y 100 $\mu\text{g/L}$) durante 7 días consecutivos en microcosmos externos de 600 litros. Los resultados de este estudio sugieren que no es probable que las concentraciones ambientalmente relevantes del antibiótico produzcan efectos tóxicos directos o

indirectos sobre la ecología de los microcosmos eutróficos tropicales de agua dulce (macroinvertebrados, zooplancton, fitoplancton, perifiton y bacterias).

A su vez, Wagil et al. (2014) informaron del riesgo ambiental moderado para el enrofloxacin, el norfloxacin y el ciprofloxacino, en función de su concentración de ocurrencia en dos ríos en el norte de Polonia y evaluaron la ecotoxicidad de estos antibióticos en cuatro especies diferentes de organismos acuáticos: bacterias bioluminiscentes marinas (*V. fischeri*), algas verdes (*Scenedesmus vacuolatus*), plantas (*L. minor* o lenteja de agua) y crustáceos (*D. magna*). Los resultados obtenidos demostraron que *L. minor* es la especie más sensible a los fármacos investigados con CE_{50} de 0.13 mg/L, 0.22 mg/L y 0.34 mg/L para norfloxacin, enrofloxacin y ciprofloxacino, respectivamente.

González-Pleiter et al. (2013) probaron la toxicidad de diferentes clases de antibióticos: amoxicilina, eritromicina, levofloxacin, norfloxacin y tetraciclina; en concentraciones entre 0.01 y 1500 mg/L, 0.001-10 mg/L, 0.01-200 mg/L, 0.01-100 mg/L y 0.01-100 mg/L, respectivamente en cianobacterias (*Anabaena*) y algas verdes (*Pseudokirchneriella subcapitata*), tanto en aislamiento, como en diferentes combinaciones. Los resultados sugieren que la eritromicina fue altamente tóxica para ambos organismos acuáticos. En la mayoría de los casos, los efectos nocivos de los antibióticos aumentaron cuando se combinaron con otros. Por lo tanto, los autores demostraron que los antibióticos pueden tener un efecto tóxico en los ecosistemas acuáticos cuando se mezclan con otras sustancias, incluso en concentraciones más bajas.

Oliveira et al. (2013) evaluaron los efectos subletales de la oxitetraciclina y la amoxicilina en embriones y adultos del pez cebra (*D. rerio*). La amoxicilina causó la eclosión prematura y malformaciones (como edema y deformidades de la cola), mientras que la oxitetraciclina causó el retraso en la eclosión de los embriones. Además, ambos antibióticos inhibieron la actividad de la enzima catalasa e indujeron la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa en los adultos expuestos. Sin embargo, sólo la oxitetraciclina indujo la actividad de la lactato deshidrogenasa, lo que indica que estos antibióticos son capaces de modificar la actividad enzimática normal en peces.

Elizalde-Velázquez et al. (2017) evaluaron el estrés oxidativo inducido por amoxicilina en cerebro, branquias, hígado y riñón de *Cyprinus carpio*. Las carpas fueron expuestas a tres concentraciones diferentes de dicho fármaco (10 ng/L, 10 µg/L y 10 mg/L) durante 12, 24, 48, 72 y 96 h, y se midieron los siguientes biomarcadores: grado de lipoperoxidación, contenido de hidroperóxidos, contenido de proteínas carboniladas y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Los resultados mostraron incrementos significativos en el grado de lipoperoxidación, el contenido de hidroperóxidos y de proteínas carboniladas en todos los órganos del estudio,

particularmente en riñón, así como cambios significativos en la actividad de las enzimas antioxidantes.

2. Conclusiones

Los antibióticos son un grupo de fármacos ampliamente utilizados alrededor del mundo, tanto en humanos como en animales y en actividades económicas del sector primario como ganadería, acuicultura, agricultura y apicultura. Diversos estudios han reportado la presencia de antibióticos no sólo en efluentes de PTAR, sino también en aguas superficiales y aguas subterráneas e incluso en el agua potable. La información disponible sobre toxicidad ecológica está limitada a los efectos letales agudos. Para organismos acuáticos, tales como bacterias, algas, invertebrados y peces, la toxicidad aguda se observa generalmente a bajas concentraciones. Aunque los datos de toxicidad aguda pueden ser utilizados para predecir el daño por exposición a altas concentraciones, estos datos no pueden reflejar las consecuencias de la exposición ambiental real, la cual involucra generalmente bajas concentraciones, pero exposiciones a largo plazo.

Los resultados reportados por diferentes autores en diversos países permiten afirmar que las concentraciones ambientales de antibióticos son potencialmente dañinas para la vida acuática, produciendo efectos tóxicos sobre las bacterias y las algas, organismos que forman la base de los ecosistemas acuáticos.

La mayoría de los estudios realizados utilizaron un solo compuesto. Se sabe que los antibióticos de los mismos o diferentes grupos pueden tener un efecto aditivo, por esta razón, el impacto de los antibióticos en el ambiente se subestima. La posibilidad de su biodegradación en el ambiente actualmente no está bien estudiada. Además de que la presencia simultánea de varios antibióticos con otros productos farmacéuticos y/o xenobióticos puede resultar en un efecto sinérgico.

A pesar de los avances en el análisis químico, el desarrollo y la optimización de las metodologías para el análisis de antibióticos en muestras de agua ambiental, continúa siendo difícil y desafiante, debido principalmente a sus diversas propiedades fisicoquímicas y bajas concentraciones (ng/L) en el ambiente, y a la complejidad de las matrices ambientales acuosas.

3. Referencias

Alós, J. I. (2009). Quinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.03.001>

Angulo, F. J., Nunnery, J. A., & Bair, H. D. (2004). Antimicrobial resistance in zoonotic enteric pathogens. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*. <https://doi.org/10.20506/rst.23.2.1499>

Baquero, F., Martínez, J. L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>

Batt, A. L., & Aga, D. S. (2005). Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/ac048512+>

Björklund, H., Bondestam, J., & Bylund, G. (1990). Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90324-G](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90324-G)

Blackwell, P. A., Kay, P., Ashauer, R., & Boxall, A. B. A. (2009). Effects of agricultural conditions on the leaching behaviour of veterinary antibiotics in soils. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.070>

Botitsi, E., Frosyni, C., & Tsiipi, D. (2007). Determination of pharmaceuticals from different therapeutic classes in wastewaters by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0804-8>

Buchberger, W. W. (2007). Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. *Analytica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.05.006>

Buchberger, W. W. (2011). Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.040>

Carvalho, I. T., & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025>

Chang, H., Hu, J., Asami, M., & Kunikane, S. (2008). Simultaneous analysis of 16 sulfonamide and trimethoprim antibiotics in environmental waters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.057>

Chee-Sanford, J. C., Mackie, R. I., Koike, S., Krapac, I. G., Lin, Y.-F., Yannarell, A. C., ... Aminov, R. I. (2009). Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes following Land Application of Manure Waste. *Journal of Environment Quality*. <https://doi.org/10.2134/jeq2008.0128>

Christian, T., Schneider, R. J., Färber, H. A., Skutlarek, D., Meyer, M. T., & Goldbach, H. E. (2003). Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*. <https://doi.org/10.1002/aheh.200390014>

Coyne, R., Hiney, M., O'Connor, B., Kerry, J., Cazabon, D., & Smith, P. (1994). Concentration and persistence of oxytetracycline in sediments under a marine salmon farm. *Aquaculture*. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90117-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90117-1)

Cromwell, G. L. (2002). Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal Biotechnology*. <https://doi.org/10.1081/ABIO-120005767>

Duong, H. A., Pham, N. H., Nguyen, H. T., Hoang, T. T., Pham, H. V., Pham, V. C., ... Alder, A. C. (2008). Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.009>

Ebert, I., Bachmann, J., Kühnen, U., Küster, A., Kussatz, C., Maletzki, D., & Schlüter, C. (2011). Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/etc.678>

Elizalde-Velázquez, A., Martínez-Rodríguez, H., Galar-Martínez, M., Dublán-García, O., Islas-Flores, H., Rodríguez-Flores, J., ... Gómez-Oliván, L. M. (2017). Effect of amoxicillin exposure on brain, gill, liver, and kidney of common carp (*Cyprinus carpio*): The role of amoxicilloic acid. *Environmental Toxicology*. <https://doi.org/10.1002/tox.22307>

Errecalde, J. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública*. Rome, Italy: FAO. Dirección de Producción y Sanidad Animal.

Gaskins, H. R., Collier, C. T., & Anderson, D. B. (2002). Antibiotics as growth promotants: Mode of action. *Animal Biotechnology*. <https://doi.org/10.1081/ABIO-120005768>

González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., ... Fernández-Piñas, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.01.020>

Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R., & Elseviers, M. (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: A cross-national database study. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)70799-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)70799-6)

Gothwal, R., & Shashidhar, T. (2015). Antibiotic Pollution in the Environment: A Review. *Clean - Soil, Air, Water*. <https://doi.org/10.1002/clen.201300989>

Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., & Jørgensen, S. E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere*. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00354-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00354-8)

Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicology Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00041-3)

Hernández-Serrano, P. (2005). *Responsible use of antibiotics in aquaculture*. *FAO Fisheries Technical Paper*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Hernández, F., Sancho, J. V., Ibáñez, M., & Guerrero, C. (2007). Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.012>

Heuer, O. E., Hammerum, A. M., Collignon, P., & Wegener, H. C. (2006). Food Safety: Human Health Hazard from Antimicrobial-Resistant Enterococci in Animals and Food. *Clinical Infectious Diseases*, 43(7), 911–916. <https://doi.org/10.1086/507534>

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., & Kratz, K. L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00337-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00337-4)

Homem, V., & Santos, L. (2011). Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. *Journal of Environmental Management*. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.05.023>

Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., & Parrella, A. (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.11.017>

Jacobsen, P., & Berglind, L. (1988). Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture*. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90120-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90120-2)

Juhel-Gaugain, M., McEvoy, J. D. G., & VanGinkel, L. A. (2000). Measurements for certification of chlortetracycline reference materials within the European Union Standards, Measurements and Testing programme. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s002160000570>

Karthikeyan, K. G., & Meyer, M. T. (2006). Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.06.030>

Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002>

Kim, S. C., & Carlson, K. (2007). Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/es060737+>

Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., & Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/es011055j>

Kostopoulou, M., & Nikolaou, A. (2008). Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.011>

Kümmerer, K. (2009a). Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>

Kümmerer, K. (2009b). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.01.023>

Kümmerer, K. (2003). Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2003.00739.x>

Lanzky, P. F., & Halting-Sørensen, B. (1997). The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms. *Chemosphere*. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00324-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00324-X)

Le-Minh, N., Khan, S. J., Drewes, J. E., & Stuetz, R. M. (2010). Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.020>

Li, M., Wei, D., & Du, Y. (2014). Acute toxicity evaluation for quinolone antibiotics and their chlorination disinfection processes. *Journal of Environmental Sciences (China)*. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.06.023>

Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M., & Portolés, A. (2008). *Farmacología básica y clínica* (18a ed.). Madrid, España: Médica Panamericana.

Lorian, V. (2005). *Antibiotics in laboratory medicine* (5th editio). Lippincott Williams & Wilkins.

Lucas, M., Mestorino, N., & Errecalde, J. (2007). Macrólidos: novedades de un clásico grupo de antimicrobianos. *Analecta Vet*, 27(1), 36–45.

Manzetti, S., & Ghisi, R. (2014). The environmental release and fate of antibiotics. *Marine Pollution Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.005>

Martins, A. F., Vasconcelos, T. G., Henriques, D. M., Frank, C. da S., König, A., & Kümmerer, K. (2008). Concentration of ciprofloxacin in Brazilian hospital effluent and preliminary risk assessment: A case study. *Clean - Soil, Air, Water*. <https://doi.org/10.1002/clen.200700171>

Mcmanus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., & Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol*, 40, 443–465. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927>

Mestres, C., & Duran, H. (2012). *Farmacología en Nutrición*. Madrid, España: Médica Panamericana.

Migliore, L., Brambilla, G., Grassitellis, A., & Dojmi di Delupis, G. (1993). Toxicity and bioaccumulation of sulphadimethoxine in *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *International Journal of Salt Lake Research*. <https://doi.org/10.1007/BF02905906>

Milić, N., Milanović, M., Letić, N. G., Sekulić, M. T., Radonić, J., Mihajlović, I., & Miloradov, M. V. (2013). Occurrence of antibiotics as emerging contaminant substances in aquatic environment. *International Journal of Environmental Health Research*. <https://doi.org/10.1080/09603123.2012.733934>

Mölstad, S., Lundborg, C. S., Karlsson, A. K., & Cars, O. (2002). Antibiotic prescription rates vary markedly between 13 European countries. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1080/00365540110080034>

Oliveira, R., McDonough, S., Ladewig, J. C. L., Soares, A. M. V. M., Nogueira, A. J. A., & Domingues, I. (2013). Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.019>

Pailler, J. Y., Krein, A., Pfister, L., Hoffmann, L., & Guignard, C. (2009). Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.042>

Park, S., & Choi, K. (2008). Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0209-x>

Pavlović, D. M., Babić, S., Horvat, A. J. M., & Kaštelan-Macan, M. (2007). Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.09.010>

Peng, X., Tan, J., Tang, C., Yu, Y., & Wang, Z. (2008). Multiresidue determination of fluoroquinolone, sulfonamide, trimethoprim, and chloramphenicol antibiotics in urban waters in China. *Environmental Toxicology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1897/06-650.1>

Petrović, M., Gonzalez, S., & Barceló, D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01105-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01105-1)

Pozo, O. J., Guerrero, C., Sancho, J. V., Ibáñez, M., Pitarch, E., Hogendoorn, E., & Hernández, F. (2006). Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.10.073>

Pruden, A., Joakim Larsson, D. G., Amézquita, A., Collignon, P., Brandt, K. K., Graham, D. W., ... Zhu, Y. G. (2013). Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environmental Health Perspectives*. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206446>

Radjenović, J., Petrović, M., Barceló, D., & Petrović, M. (2007). Advanced mass spectrometric methods applied to the study of fate and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.10.002>

Rico, A., Dimitrov, M. R., Van Wijngaarden, R. P. A., Satapornvanit, K., Smidt, H., & Van den Brink, P. J. (2014). Effects of the antibiotic enrofloxacin on the ecology of tropical eutrophic freshwater microcosms. *Aquatic Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.008>

Samanidou, V. F., Nikolaidou, K. I., & Papadoyannis, I. N. (2007). Advances in chromatographic analysis of tetracyclines in foodstuffs of animal origin - A review. *Separation and Purification Reviews*. <https://doi.org/10.1080/15422110600822758>

Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>

Schuster, A., Hädrich, C., & Kümmerer, K. (2008). Flows of active pharmaceutical ingredients originating from health care practices on a local, regional, and nationwide level in Germany-is hospital effluent treatment an effective approach for risk reduction? *Water, Air, and Soil Pollution: Focus*. <https://doi.org/10.1007/s11267-008-9183-9>

Seifrtová, M., Nováková, L., Lino, C., Pena, A., & Solich, P. (2009). An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.031>

Seija, V., & Vignoli, R. (2016). Principales grupos de antibióticos. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*.

Terzić, S., Senta, I., Ahel, M., Gros, M., Petrović, M., Barcelo, D., ... Jabučar, D. (2008). Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.03.003>

Thiele-Bruhn, S. (2003). Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - A review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. <https://doi.org/10.1002/jpln.200390023>

Tong, L., Li, P., Wang, Y., & Zhu, K. (2009). Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.051>

van der Grinten, E., Pikkemaat, M. G., van den Brandhof, E. J., Stroomberg, G. J., & Kraak, M. H. S. (2010). Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial

and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere*.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.011>

Vicente, D., & Pérez-Trallero, E. (2010). Tetraciclina, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.10.002>

Vojinović-Miloradov, M., Turk-Sekulić, M., Radonić, J., Mihajlović, I., & Stosić, M. (2011b). Emerging substances of concern – a shift in traditional thinking. In *15th International ECO-conference, 9th ECO-conference on "Environmental protection of urban and suburban settlements"* (pp. 256–271).

Vojinović-Miloradov, M., Turk-Sekulić, M., Radonić, J., Spanić, I., Kiurski, J., Milovanović, D., & Mihajlović, I. (2011a). Pseudo-persistent pollutant in the environment: emerging substance. In *Proceedings of the 17th International Symposium on Analytical and Environmental Problems* (pp. 180–184).

Wagil, M., Kumirska, J., Stolte, S., Puckowski, A., Maszkowska, J., Stepnowski, P., & Białk-Bielińska, A. (2014). Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland. *Science of the Total Environment*.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.082>

Watkinson, A. J., Murby, E. J., & Costanzo, S. D. (2007). Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.005>

Wise, R. (2002). Antimicrobial resistance: Priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1093/jac/49.4.585>

Xu, W., Zhang, G., Zou, S., Li, X., & Liu, Y. (2007). Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass

spectrometry. *Environmental Pollution* (Barking, Essex: 1987).
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.05.038>

Zhao, J. L., Liu, Y. S., Liu, W. R., Jiang, Y. X., Su, H. C., Zhang, Q. Q., ... Ying, G. G. (2015). Tissue-specific bioaccumulation of human and veterinary antibiotics in bile, plasma, liver and muscle tissues of wild fish from a highly urbanized region. *Environmental Pollution* (Barking, Essex: 1987).
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.026>

The background of the cover is a detailed illustration of various vintage scientific apparatuses, including flasks, tubes, and a battery, rendered in a sepia tone. A large, semi-transparent reddish-brown rectangle is centered over the image, containing the title and authors' names.

RETOS ACTUALES DE LA FARMACIA

LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN
MARIANA ORTIZ REYNOSO
HARIZ ISLAS FLORES
JONNATHAN G. SANTILLAN BENITEZ
ENRIQUE MORALES ÁVILA

(Coordinadores)



Universidad Autónoma
del Estado de México

Retos actuales de la farmacia

Esta obra acreditó el proceso de revisión por pares bajo la modalidad doble ciego, recurriendo a dictaminadores externos a la institución editora.

Primera edición, noviembre 2019

Retos actuales de la farmacia

Leobardo Manuel Gómez Oliván, Mariana Ortiz Reynoso, Hariz Islas Flores,
Jonnathan Guadalupe Santillan Benitez, Enrique Morales Ávila
(Coordinadores)

Universidad Autónoma del Estado de México
Av. Instituto Literario 100 Ote.
Toluca, Estado de México

C.P. 50000

Tel: (52) 722 277 3835 y 36

<http://www.uaemex.mx>



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional. Puede ser utilizada con fines educativos, informativos o culturales, siempre que se cite la fuente. Disponible para su descarga en acceso abierto en: <http://ri.uaemex.mx/>

Citación:

Gómez Oliván, Leobardo Manuel; Ortiz Reynoso, Mariana; Islas Flores, Hariz; Santillan Benitez, Jonnathan Guadalupe; Morales Ávila, Enrique (2019). *Retos actuales de la farmacia*, México, Universidad Autónoma del Estado de México.

ISBN: 978-607-633-130-9

Hecho en México

Made in Mexico

ÍNDICE

PRÓLOGO	11
 Variantes genéticas que influyen en el desarrollo de úlcera de pie diabético y neuropatías en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 <i>Claudia Miriam Alonzo De la Rosa, Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez, Miriam Verónica Flores Merino</i>	 13
 Polimorfismos de nucleótido único asociados con el tratamiento para carcinoma de células renales metastásico <i>Raúl Gerardo Haro Díaz, Saúl Campos Gómez, Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez, Leobardo Manuel Gómez Oliván</i>	 35
 Análisis de expresión génica en líneas celulares de cáncer de mama <i>Rodolfo López Linares, Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez</i>	 59
 Polimorfismo del CYP1a1 Ile462Val y su relación con diversos tipos de cáncer ¿Efecto causante o protector? Una revisión <i>Esmeralda Michelle Sánchez Ocampo, Leobardo Manuel Gómez Oliván, Guillermo Elizondo Azuela, Mineko Shibayama Salas</i>	 87
 En busca del perfil genético de la preeclampsia <i>Sindy SanJuan Reyes, Leobardo Manuel Gómez Oliván, Jonnathan G. Santillán Benítez, Hariz Islas Flores, Octavio Dublán García</i>	 119

Epigenética en cáncer: una oportunidad para la prevención,
tratamiento y nuevas estrategias terapéuticas
*Jesús Enrique Sánchez Flores, Enrique Morales Avila,
Jonnathan G. Santillán Benítez, Hariz Islas Flores* 157

Ecofarmacovigilancia de hipolipemiantes (estatinas y fibratos).
Efectos en organismos acuáticos
*Edgar David González González, Leobardo Manuel Gómez Oliván,
Marcela Galar Martínez, Hariz Islas Flores, María Dolores Hernández Navarro* 179

Tecnovigilancia: el nuevo enfoque del farmacéutico
*Mayred Yeselin León García, Martha Díaz Flores,
Mariana Ortiz Reynoso, Víctor Manuel Elizalde Valdés* 201

Conocimientos, habilidades y actitudes en farmacovigilancia entre
profesionales de la salud y utilidad de las intervenciones educativas
como herramienta de mejora de estos
Jesús Mata Maldonado, Mariana Ortiz Reynoso 223

Ketamina, usos clínicos en humanos
*Mario Ángel Rosas Sánchez, Ma. Victoria Domínguez García,
Miriam V. Flores Merino* 249

Disolución intrínseca: revisión de su utilidad en la industria farmacéutica
Edna Teresa Alcántara Fierro, Mariana Ortiz Reynoso 275

- Evaluación del efecto del aglutinante y la velocidad de agitación de un
granulador de alto corte en las características fisicoquímicas de un
granulado de valproato de magnesio
*Diego Gorostieta Hernández, Mariana Ortiz Reynoso, Martha Díaz Flores,
Liliana Schifter Aceves* 309
- Estudio comparativo del control de la liberación del valproato de magnesio
en matrices hidrofílicas de HPC y HPMC
Wendy C. Sánchez Brito, Mariana Ortiz Reynoso 339
- Cicloadiciones (3 + 2) azida-enolato como herramienta para la obtención
de compuestos antifúngicos: síntesis de análogos nucleosídicos y del miconazol
*Davir González Calderón, Aydeé Fuentes Benítez,
Carlos González Romero* 375

ECOFARMACOVIGILANCIA DE HIPOLIPEMIANTES (ESTATINAS Y FIBRATOS). EFECTOS EN ORGANISMOS ACUÁTICOS

Edgar David González González^{1}*

Leobardo Manuel Gómez Oliván¹

Marcela Galar Martínez²

Hariz Islas Flores¹

María Dolores Hernández Navarro¹

Existe una creciente preocupación por el hallazgo de medicamentos en el ambiente acuático y la ecofarmacovigilancia es la disciplina que estudia dicha problemática, analizando la ocurrencia, destino y efectos para los seres humanos y para otros organismos en el ambiente. Los reductores de lípidos son uno de los grupos de medicamentos más comúnmente detectados en el medio acuático, donde se han detectado (en concentraciones del orden de ng L^{-1} o $\mu\text{g L}^{-1}$) como fármacos inalterados y metabolitos. A pesar de que la mayoría de los efectos agudos y crónicos que puedan tener en los ecosistemas son desconocidos, hay algunos efectos negativos comprobados. La presente revisión tiene como objetivo reunir los principales datos sobre el potencial ecotoxicológico de las estatinas y fibratos en organismos acuáticos.

INTRODUCCIÓN

En un contexto de contaminación farmacéutica severa, la ecofarmacovigilancia (EFV) ha sido un área de interés novedosa. Su objetivo es garantizar que los problemas ambientales, significativos, asociados con los productos farmacéuticos en el medio ambiente se identifiquen de manera oportuna y se gestionen adecuadamente, convirtiéndose en un punto clave de investigación como ciencia integral y de límites

¹ Universidad Autónoma del Estado de México

* ed.gonzalezg@hotmail.com

² Instituto Nacional Politécnico

en el mundo, y los requisitos regulatorios que rigen la evaluación integral del riesgo ambiental de los productos farmacéuticos (Wang y Hu, 2014).

El término EFV fue acuñado por primera vez por Giampaolo Velo para indicar una disciplina emergente que se puede definir como “la ciencia y las actividades de detección, evaluación, comprensión y prevención de los efectos negativos relacionados con la presencia de productos farmacéuticos en el medio ambiente” (Murray Smith, 2010). Esta definición se toma directamente de la definición de farmacovigilancia dada por la Organización Mundial de la Salud (OMS): “la disciplina y el conjunto de actividades destinadas a identificar, evaluar y prevenir los efectos adversos u otros problemas relacionados con el uso de medicamentos” (World Health Organization, 2002).

Actualmente, la ecofarmacovigilancia se puede definir como la ciencia y actividades relacionadas con la detección, evaluación, comprensión y prevención de los efectos adversos u otros problemas relacionados con la presencia de productos farmacéuticos en el medio ambiente, que afectan a humanos y a otras especies animales (Silva, Lino, Meisel, Barceló y Pena, 2012).

Debido al aumento de la producción y el consumo de medicamentos en todo el mundo, cada vez más productos farmacéuticos se liberan al sistema de alcantarillado por excreción (después del uso terapéutico humano y veterinario), descargas de fabricación, eliminación directa de medicamentos (no deseados o caducados), que finalmente ingresan en una variedad de matrices ambientales, incluidas aguas superficiales y subterráneas, sedimentos, suelos e incluso en agua potable (Daughton, 2016; Holm et al., 2013).

Los productos farmacéuticos más comúnmente detectados en el medio acuático incluyen antibióticos, fármacos antiinflamatorios, agentes hipolipemiantes y anticonvulsivos (Fent, Weston y Caminada, 2006); estos residuos farmacéuticos podrían causar efectos nocivos en los organismos ambientalmente expuestos.

Los reguladores de lípidos se informan con frecuencia en aguas residuales, superficiales y subterráneas, debido a su mayor uso en los últimos años (Andreozzi, Marotta y Paxéus, 2003; Gros, Petrović y Barceló, 2006; Lin y Reinhard, 2005; Sanderson, Johnson, Wilson, Brain y Solomon, 2003; Schmidt, O'Rourke, Hernan y Quinn, 2011; Togola y Budzinski, 2007).

Fármacos hipolipemiantes

Los triglicéridos (TGC) y el colesterol son componentes esenciales del organismo. Entre, otras funciones, los TGC constituyen una forma de almacenamiento de energía, y el colesterol es necesario como unidad estructural de las membranas biológicas. Ambos lípidos son insolubles en agua y han de ser envasados para poder ser transportados en los medios acuosos de la linfa y la sangre. Para ello, pequeñas cantidades de lípidos son rodeados por una capa de fosfolípidos, en la cual también se depositan proteínas: las apolipoproteínas (A). Según la cantidad y proporción de lípidos almacenados, y la naturaleza de las A, pueden distinguirse: quilomicrones y partículas de muy baja densidad (VLDL), de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL).

En el metabolismo de las lipoproteínas, las células del epitelio intestinal traspasan los lípidos absorbidos principalmente a la linfa en forma de quilomicrones ricos en triglicéridos. Éstos llegan al torrente circulatorio sin pasar por el hígado, y así aportan los ácidos grasos a los diferentes tejidos, bajo la acción de la lipoproteinlipasa presente en el endotelio. Las partículas restantes llegan a la célula hepática, a la que proveen el colesterol procedente de la dieta.

El hígado cubre sus necesidades de colesterol en su mayor parte (60%) mediante la síntesis *de novo* a partir de la acetil-coenzima-A. Su velocidad está regulada por la actividad de una reductasa, la hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa: paso de conversión de la HMG-CoA en ácido mevalónico. El hígado necesita colesterol para la síntesis de partículas VLDL y ácidos biliares. Las partículas VLDL ricas en TGC se vierten al torrente sanguíneo y proveen a otros tejidos de ácidos grasos, en forma similar a los quilomicrones. Quedan como residuo las partículas LDL residuales, que o bien retornan al hígado o sirven como suministro de colesterol para tejidos extrahepáticos.

Las partículas LDL portan la apolipoproteína B100, mediante la cual se unen a los receptores que intervienen en la introducción de LDL en la célula, incluidos los hepatocitos (endocitosis mediada por receptores). Las partículas HDL tienen la capacidad de recoger colesterol de las células y transferirlo a las partículas LDL. De esta forma el colesterol es transportado desde los tejidos hacia el hígado (Lüllmann et al, 2010).

Para descender los niveles lipídicos existen diversos fármacos, pertenecientes a seis grupos de medicamentos (Canalizo et al., 2013), con mecanismos de acción y efectos distintos sobre las LDL (colesterol) y VLDL (triglicéridos):

- a) Inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas).
- b) Inhibidores de la absorción del colesterol (ezetimiba).
- c) Secuestradores de ácidos biliares.
- d) Derivados del ácido nicotínico.
- e) Derivados del ácido fibríco (fibratos, como bezafibrato y gemfibrozilo).
- f) Ácidos grasos omega-3.

Los fibratos y las estatinas son los principales medicamentos hipolipemiantes que se prescriben solos o en terapia de combinación para disminuir los niveles de colesterol en plasma y reducir la incidencia de enfermedad coronaria. Aunque parcialmente desplazado por las estatinas, el número total de prescripciones de fibratos está en constante aumento (Holoshitz et al., 2008). Estos últimos han sido analizados con mayor frecuencia en el medio acuático que los primeros. Ambos tipos se usan para disminuir la concentración de colesterol (estatinas y fibratos) y triglicéridos (fibratos) en el plasma sanguíneo.

Los fármacos hipocolesterolémicos, también conocidos como estatinas, se han detectado en aguas superficiales en concentraciones que varían entre ng L^{-1} y $\mu\text{g L}^{-1}$ (Gracia Lor et al., 2011; Grung et al., 2007; Langford y Thomas, 2011; Metcalfe et al., 2003), aunque los datos sobre las concentraciones ambientales de simvastatina son aún escasos.

Las estatinas, como inhibidores de la síntesis de colesterol, actúan inhibiendo la HMG-CoA reductasa, responsable del paso limitante en la síntesis del colesterol, concretamente la conversión de HMG-CoA en mevalonato (Laufs y Liao, 1998). Las estatinas compiten con HMG-CoA por el sitio activo de la enzima, alterando su conformación e inhibiendo su función, disminuyendo así la síntesis de colesterol (Blumenthal, 2000). Como consecuencia del agotamiento del colesterol intracelular, la expresión de los receptores de LDL en las membranas de los hepatocitos aumenta y, por lo tanto, la resorción del colesterol LDL del plasma sanguíneo.

La mayoría de las estatinas se administran en la forma de ácido biológicamente activo, a excepción de simvastatina y lovastatina que se administran como el profármaco lactona (Fujino, Saito, Tsunenari, Kojima y Sakaeda, 2004). *In vivo*, las formas de ácido y lactona se interconvierten en plasma hasta que se alcanza el equilibrio (KeRNAey, Crawford, Mehta y Radebaugh, 1993). El profármaco lactona generalmente tiene una mayor toxicidad que la forma ácida biológicamente activa de las estatinas, presumiblemente debido a su mayor potencial de difusión pasiva a

través de las membranas celulares (Skottheim, Gedde-Dahl, Hejazifar, Hoel y Åsberg, 2008). Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo completo de la toxicidad por estatinas (Evans y Rees, 2002).

Por el contrario, los efectos de los fibratos están mediados, al menos en parte, a través de alteraciones en la transcripción de genes que codifican proteínas que controlan el metabolismo de las lipoproteínas. Los fibratos actúan probablemente activando la enzima lipoproteína lipasa, que es principalmente responsable de la conversión de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) a lipoproteínas de alta densidad (HDL), disminuyendo así la concentración plasmática de triglicéridos. La unión de fibratos a receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR), receptores nucleares que se sabe que se activan durante diferentes rutas celulares, estimula la expresión de varias proteínas reguladoras de lípidos tales como, la lipoproteína lipasa (Staels et al, 1998).

Los fibratos son una clase de medicamentos derivados del ácido fíbrico ampliamente utilizados para reducir los triglicéridos plasmáticos y elevar el nivel de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL). Sus formas activas, los ácidos fíbricos, ejercen sus efectos biológicos uniéndose al receptor activado por proliferadores peroxisómicos tipo alfa (PPAR α), un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción activados por ligando. Se ha afirmado que la mayoría de los fibratos se excretan sin modificar (Isidori, Nardelli, Pascarella, Rubino y Parrella, 2007).

El ácido clofíbrico es un metabolito activo del clofibrato, el ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropanoico, y un fármaco persistente utilizado como regulador lipídico que se ha detectado en aguas superficiales, incluso años después de que dejara de utilizarse (Buser, Müller y Theobald, 1998). Los primeros resultados relativos a la presencia ambiental de ácido clofíbrico fueron informados por (Garrison, Pope y Allen, 1976). Estos autores detectaron el compuesto a bajos niveles de concentración (ng L⁻¹) en aguas residuales tratadas. Posteriormente, se reportó la presencia de ácido clofíbrico en otros estudios en concentraciones de 0.049-0.066 mg L⁻¹ en aguas superficiales (Ternes, 1998; Tixier, Singer, Oellers y Müller, 2003) y de hasta 270 ng L⁻¹ en agua potable (Heberer y Stan, 1997). La presencia de este fármaco en PTAR ha sido reportada repetidamente después de su detección en el efluente de una planta de tratamiento alemana (Andreozzi et al., 2003; Tauxe-Wuersch et al., 2005; Ternes, 1998).

El bezafibrato, ácido 2-[4-[2-[(4-clorobenzoil)amino]etil]fenoxi]-2-metil-propanoico, es un fármaco ampliamente utilizado como regulador lipídico, cuyo consumo ha aumentado considerablemente durante los últimos años (Lambropoulou *et al.*, 2008). Debido a su gran uso y su persistencia, se ha detectado bezafibrato en aguas superficiales y potables, así como en efluentes de plantas tratadoras de aguas residuales (PTAR) en el rango de ng L^{-1} (Fent *et al.*, 2006; Metcalfe, Koenig *et al.*, 2003; Metcalfe Miao, *et al.*, 2003).

El gemfibrozilo, ácido 5-(2, 5-dimetilfenoxi)-2,2-dimetilpentanoico, es también un agente regulador de lípidos que se usa cada vez más, clasificado genéricamente como un derivado del ácido fíbrico (Sanderson *et al.*, 2003) se encontraron niveles alrededor de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ en efluentes de PTAR. (Metcalfe, Koenig, *et al.*, 2003; Metcalfe *et al.*, 2003) Detectaron valores similares ($0.75\text{-}1.50 \mu\text{g L}^{-1}$) para las concentraciones más altas de gemfibrozilo en aguas superficiales.

Como un tipo de compuestos biológicamente activos diseñados para ser efectivos en bajas concentraciones, los productos farmacéuticos en el ambiente natural podrían tener posibles impactos adversos para una variedad de organismos no específicos debido a exposiciones a largo plazo, incluyendo toxicidad crónica, resistencia a antibióticos, disrupción endocrina, los efectos tóxicos en la reproducción de organismos terrestres y acuáticos, incluso se convierten en un problema creciente de salud pública (Gao *et al.*, 2012; Nödler *et al.*, 2014).

Efecto de hipolipemiantes en organismos acuáticos

La presencia de estos productos farmacéuticos en ambientes acuáticos genera preocupación con respecto a sus efectos sobre las especies no objetivo. Esto es especialmente relevante para los teleósteos, donde la hipercolesterolemia es una condición normal (Larsson y Fänge, 1977). Los peces y los salmónidos en particular son susceptibles a las lesiones ateroscleróticas en las arterias coronarias, que se atribuyen no a la hipercolesterolemia en sí, sino a la tasa de crecimiento y la madurez sexual (Saunders *et al.*, 1992). En general, la concentración plasmática de colesterol en la mayoría de las especies de peces es 2-6 veces mayor que la de los mamíferos (Babin y Vernier, 1989; Larsson y Fänge, 1977).

Los datos sobre esta clase de compuestos son escasos. Los fibratos se han evaluado mediante pruebas de toxicidad tradicionales. Se encontraron los siguientes NOEC para el ácido clofibrico en la pulga de agua *Ceriodaphnia dubia* [NOEC (7 días) = 640 $\mu\text{g L}^{-1}$], el rotífero planctónico *Brachionus calyciflorus* [NOEC (2 días) = 246 $\mu\text{g L}^{-1}$], y en etapas tempranas de la vida del pez cebra *Danio rerio* [NOEC (10 días) = 70 mg L^{-1}] (Ferrari et al., 2003). El gemfibrozilo se encontró en el plasma sanguíneo del pez dorado (*Carassius auratus*), después de la exposición durante 14 días a niveles 113 veces mayores que en el agua (factor de bioconcentración de 113). La testosterona plasmática se redujo en más del 50% después de la exposición a 1.5 y 10 mg L^{-1} , así como los niveles de transcripción de la proteína reguladora aguda esteroideogénica (StAR) en testículos del pez dorado (Mimeault et al., 2005).

Bioensayos y estudios ecotoxicológicos sobre los efectos del bezafibrato (BEZ) con el pez *Pimephales promelas*, la cianobacteria *Anabaena* o el hidroide *Hydra* atenúan el efecto revelado de las concentraciones en el rango de mg L^{-1} , que es mucho más alto que el encontrado en el ambiente (Quinn et al, 2004; Rosal et al, 2010; Weston et al, 2009).

Además, en el bivalvo *Mytilus galloprovincialis*, concentraciones muy bajas de BEZ provocaron alteraciones en la glucólisis, el equilibrio redox y la función peroxisomal de la glándula digestiva (Canesi et al., 2007), evidenciando así que las concentraciones ambientales de BEZ pueden modificar las funciones celulares fundamentales, por lo tanto, crea condiciones adversas para organismos no objetivo.

Isidori y su equipo (2007) evaluaron la ecotoxicidad de los fibratos. Se investigaron los siguientes compuestos: bezafibrato, fenofibrato y gemfibrozilo. Se realizaron bioensayos sobre *Vibrio fischeri*, *Brachionus calyciflorus*, *Ceriodaphnia dubia*, *Thamnocephalus platyurus* y *Daphnia magna* para evaluar la toxicidad aguda y crónica. Los resultados mostraron que la toxicidad aguda estaba en el orden de docenas de mg L^{-1} para todos los niveles tróficos utilizados en los bioensayos (bacterias, rotíferos y microcrustáceos). La exposición crónica a estos compuestos causó la inhibición de la población de crecimiento en rotíferos y crustáceos, mientras que las algas parecían estar ligeramente afectadas por esta clase de productos farmacéuticos.

El bezafibrato (BEZ), la carbamazepina (CBZ) y el ibuprofeno (IBU) se probaron para determinar su potencial de bioacumulación y provocar cambios moleculares en el organismo no diana, *Dreissena polymorpha*. Cambios en el RNAm de enzimas y otras proteínas implicadas en la prevención del daño proteico (proteína de choque térmico

70, hsp70) y estrés oxidativo (superóxido dismutasa y catalasa), biotransformación (glutación S-transferasa clase pi, piGST), eliminación y modificación postraduccional de la proteína reversible (fosfatasa 2A) sirvieron como biomarcadores moleculares. Los mejillones se expusieron en un sistema de flujo continuo a concentraciones crecientes de los tres fármacos (1, 10, 100 y 1000 nM); las concentraciones más bajas corresponden a aquellas ambientalmente relevantes detectadas en aguas superficiales y efluentes, respectivamente. El estudio demostró claramente que CBZ e IBU pueden acumularse en los mejillones, especialmente a bajas concentraciones en tan sólo unos pocos días. Además, la exposición a una concentración de BEZ ambientalmente relevante provocó un aumento inmediato en el nivel de transcrito mejorado de la glándula piGST en la glándula digestiva, seguido de una regulación ascendente de la hsp70 después de cuatro y siete días que evidencia una condición de estrés crónico para los mejillones. Los cambios moleculares debidos a la exposición a CBZ, IBU y BEZ fueron detectables a las concentraciones de exposición que se encuentran en las aguas superficiales (Contardo Jara et al., 2011).

La toxicidad puede evaluarse a partir de los valores de la CE_{50} , según las categorías establecidas en la orientación técnica sobre evaluación de riesgos de sustancias en la Unión Europea (European Commission, 2003). En ella, las muestras de aguas residuales o compuestos estándar se consideran “dañinos para los organismos acuáticos” si la CE_{50} cae en el rango de 10-100 mg L⁻¹, “tóxico” si la $1 < CE_{50} < 10$ mg L⁻¹ y “muy tóxico” si la $CE_{50} < 1$ mg L⁻¹.

Rosal e investigadores (2010) realizaron un estudio para evaluar la toxicidad aguda del bezafibrato, ácido clofíbrico, gemfibrozilo y ácido fenofíbrico, un metabolito del fenofibrato cuya ecotoxicidad no se ha informado previamente, en organismos acuáticos (*Anabaena*, *Daphnia magna* y *Vibrio fischeri*). La mayor toxicidad correspondió al ácido fenofíbrico, con una CE_{50} tan baja como 1.72 mg L⁻¹ para *V. fischeri*. El gemfibrozilo también fue tóxico para *Anabaena* con una CE_{50} de 4.42 mg L⁻¹. El estudio informa los resultados de las pruebas de toxicidad utilizando muestras fortificadas de aguas residuales reales tomadas del efluente de una PTAR. El agua residual en sí misma resultó ser muy tóxica para *Anabaena* (84% de la inhibición de la bioluminiscencia), mientras que no tuvo ningún efecto negativo sobre *D. magna* o *V. fischeri*. Por el contrario, la luminiscencia de *V. fischeri* exhibió un efecto estimulante en las aguas residuales. El bioensayo con *Anabaena* reveló un cierto riesgo asociado con los tres compuestos menos tóxicos probados. En base a los bioensayos

con *V. fischeri* y *D. magna*, el bezafibrato y el gemfibrozilo se habrían considerado no tóxicos y nocivos, respectivamente. El uso de datos de las CE_{50} medidos en aguas residuales aumenta la estimación del riesgo.

Los estudios disponibles con gemfibrozilo (GEM) han demostrado su capacidad para afectar el comportamiento de alimentación del cnidario *Hydra attenuata* (Quinn, Gagné y Blaise, 2008) y el crecimiento del alga *Chlorella vulgaris* (Zurita et al., 2007), así como para activar las enzimas antioxidantes e interferir con la expresión de la metalotioneína. En el mejillón azul (*Mytilus edulis*) (Schmidt et al., 2011) y el mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) (Quinn et al., 2011). Se mostró que la exposición a GEM afecta el desarrollo y la actividad locomotora de las larvas del pez cebra (*Danio rerio*) (Henriques et al., 2016).

La toxicidad del gemfibrozilo (GEM) se ha evaluado en algunos estudios. La exposición (durante 5-28 días) a GEM (en concentraciones de $0.38 \mu\text{g L}^{-1}$ - 15mg L^{-1}) indujo el síndrome de malabsorción embrionaria en larvas del pez cebra, *Danio rerio* (Raldúa et al., 2008) y causó daño genotóxico en peces cebra adultos (Rocco et al., 2010). Además, la exposición (durante 2-21 días) a GEM (en concentraciones de 1.5 - $1500 \mu\text{g L}^{-1}$) redujo los niveles plasmáticos de colesterol, alteró la abundancia de genes implicados en el metabolismo de los lípidos y redujo la fecundidad, pero no pareció afectar los niveles plasmáticos de triglicéridos o esteroides sexuales en la carpa cabeza (*Pimephales promelas*) (Skolness et al., 2012).

Del mismo modo, el gemfibrozilo causó efectos tanto moleculares como citogenéticos en los eritrocitos de *Sparus aurata* después de 96 horas de exposición. Los hallazgos del presente estudio son ecológicamente relevantes ya que el gemfibrozilo fue capaz de inducir efectos genotóxicos en concentraciones observadas en el medio ambiente ($1.5 \mu\text{g L}^{-1}$) (Barreto et al, 2017).

Pocos estudios han investigado el efecto de las estatinas en organismos no objetivo. Se observó la inhibición del crecimiento en la lenteja de agua *Lemna gibba* (Brain et al, 2006) y la formación anormal del intestino en larvas de rana, después de la exposición a atorvastatina y lovastatina (Richards y Cole, 2006).

Ellesat y equipo (2010), realizaron la cuantificación de los efectos citotóxicos de las formas de ácido y lactona de dos estatinas, atorvastatina y simvastatina, así como de sus metabolitos en los hepatocitos de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Los hepatocitos se expusieron durante 24, 48 y 72 horas a diferentes concentraciones de cada sustancia de prueba (0.4 - $400 \mu\text{M}$). La citotoxicidad se midió como la inhibición

metabólica y la pérdida de la integridad de la membrana. Los resultados mostraron que la atorvastatina y simvastatina tuvieron efectos citotóxicos dependientes de la dosis en los hepatocitos. Concluyendo que la simvastatina es más tóxica que la atorvastatina y la lactona es más tóxica que la forma ácida.

En vertebrados, las estatinas disminuyen la síntesis de colesterol a través de la inhibición competitiva de la enzima HMG-CoA reductasa, responsable del paso limitante en la vía del mevalonato (Burg y Espenshade, 2011; Fent et al., 2006). Curiosamente, mientras que los vertebrados obtienen colesterol de la vía del mevalonato, el colesterol no se sintetiza *de novo* en los artrópodos (Li et al., 2003). Los crustáceos, por ejemplo, sintetizan el fRNAesoato de metilo (MF) en la ruta biosintética del mevalonato, que comparte la mayoría de los pasos enzimáticos con los vertebrados (Bellés et al., 2005; Neuparth et al., 2014). Por lo tanto, aunque se dirige a la misma enzima tanto en vertebrados como en artrópodos, es probable que el resultado esperado de la inhibición de HMG-CoA reductasa difiera debido a las diferentes vías descendentes (Neuparth et al., 2014).

Dado el papel central del MF en la reproducción de crustáceos, recientemente (Neuparth et al., 2014) evaluaron los efectos (supervivencia, crecimiento y reproducción, con biomarcadores histopatológicos en hepatopáncreas y gónadas) causados por la exposición crónica a simvastatina (64 ng L^{-1} a $8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) en el anfípodo *Gammarus locusta*. Los hallazgos mostraron que la exposición crónica a simvastatina afectó severamente el crecimiento, la reproducción y la maduración de las gónadas de *G. locusta*, concomitante a cambios a nivel histológico.

La toxicidad aguda de SIM ha sido demostrada previamente para algunos crustáceos, como el copépodo harpacticoide *Nitocra spinipes* ($CL_{50} = 810 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) y la larva de camarón fantasma (*Palaemonetes pugio*) ($CL_{50} = 1180 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) (Dahl et al., 2006; Key et al., 2008).

Se informan varios efectos tóxicos de atorvastatina (ATV) especialmente en embriones del pez cebra. La exposición (durante 24 horas) a ATV (en concentraciones 6 mg L^{-1}) bloqueó la migración de células germinales primordiales (Thorpe et al., 2004). Además, la exposición (durante 48 horas) a ATV (en concentraciones de $0.03\text{-}1 \text{ mg L}^{-1}$) afectó la estabilidad de los vasos sanguíneos e indujo accidente cerebrovascular hemorrágico (Eisa Beygi et al., 2013; Gjini et al., 2011). Las exposiciones hídricas (durante 5-14 días) a ATV (en concentraciones de $0.2\text{-}10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) también indujeron daño genotóxico en el pez cebra adulto (Rocco et al.,

2010) y regularon positivamente la abundancia de genes implicados en el transporte de membrana, respuesta al estrés oxidativo y biotransformación en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Ellesat et al., 2012).

En un estudio realizado por (Al-Habsi et al., 2016) se examinaron los efectos del GEM y la ATV en peces cebrá (hembras y machos) después de una exposición dietética de 30 días. La exposición provocó cambios en varios parámetros bioquímicos (reducción de colesterol, triglicéridos, cortisol, testosterona y estradiol). Los cambios en la concentración de colesterol y triglicéridos se asociaron con alteraciones en los niveles de transcripción de genes clave relacionados con el colesterol y la regulación de lípidos. Este estudio respalda que estos medicamentos afectan el metabolismo del colesterol y la producción de esteroides en el pez cebrá adulto, concluyendo que la reducción de cortisol puede perjudicar la capacidad de estos peces para generar una respuesta de estrés adecuada, mientras que la reducción de esteroides sexuales puede afectar negativamente la reproducción.

Saravanan y equipo (2014) investigaron la toxicidad del ácido clofíbrico (CA) y diclofenaco (DCF) en la carpa mayor india, *Cirrhinus mrigala*. Los alevines de *C. mrigala* se expusieron a diferentes concentraciones (1, 10 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) de CA y DCF durante un período de 96 h (corto plazo) y 35 días (largo plazo). Se evaluaron los efectos tóxicos de los fármacos sobre la hormona estimulante de la tiroides (TSH), la tiroxina (T4) y la triyodotironina (T3). Durante el período de exposición a corto y largo plazo, se encontró que el nivel de TSH disminuía en todas las concentraciones de AC en comparación con los grupos de control. Se encontró que el nivel de T4 disminuía a 1 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de exposición a CA al final de 96 h. Sin embargo, el nivel de T4 disminuyó en todas las concentraciones de CA y DCF durante el período de exposición a largo plazo (35 días). Los peces expuestos a todas las concentraciones de CA y DCF tuvieron un menor nivel de T3 en ambos tratamientos. Estos resultados sugieren que los fármacos CA y DCF indujeron cambios significativos en los niveles hormonales tiroideos de *C. mrigala*.

Estudios previos demuestran los efectos del ácido clofíbrico sobre los niveles de colesterol, el precursor de todas las hormonas esteroideas sexuales. De hecho, la exposición de la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), la carpa cabezona (*Pimephales promelas*) y el pez cebrá (*Danio rerio*) a fibratos redujo los niveles de colesterol en plasma y, en consecuencia, indujo efectos hipocolesterolémicos (Du et al., 2008; Owen et al., 2010; Velasco Santamaría et al., 2011).

Un estudio realizado por (Coimbra et al., 2015) mostró que la exposición crónica del pez cebra (*D. rerio*) al ácido clofíbrico (en concentraciones de 1 y 10 mg/g) afecta la acumulación de triglicéridos en el músculo y el crecimiento de los peces, e impacta la fecundidad, el desarrollo de las gónadas, la proporción de sexos y el desarrollo de los embriones. Todos estos efectos se producen de forma concomitante con los cambios en los niveles de transcripción de genes clave implicados en la homeostasis lipídica, tanto en los peces expuestos como en su progenie, lo que sugiere el desencadenamiento de mecanismos epigenéticos, que da más apoyo a una interrupción multigeneracional de las vías de señalización de lípidos.

Las interacciones toxicológicas entre hipolipemiantes han sido ensayadas, (Rodea Palomares et al., 2010) estudiaron la interacción toxicológica de los reguladores de lípidos (gemfibrozilo, bezafibrato y ácido fenofíbrico), usando el índice de combinación-isoblograma. Este estudio se realizó utilizando dos microorganismos bioluminiscentes acuáticos, la bacteria marina *Vibrio fischeri* y una cianobacteria del género *Anabaena*. Para la bacteria marina, la interacción predominante fue antagonica a bajos niveles de efecto (*fa*), cambiando a sinergismo a niveles de efecto más altos. *Anabaena* mostró efectos de sinergia y antagonismo, el primero predominó a niveles de efecto por debajo de 0.4-0.5 y el segundo por valores más altos. Para la cianobacteria, las mezclas ternarias fueron generalmente más sinérgicamente tóxicas que sus binarias correspondientes.

CONCLUSIÓN

La ecofarmacovigilancia, como un tipo de vigilancia para el medio ambiente, tiene como objetivo práctico, minimizar los riesgos potenciales que plantea la presencia de productos farmacéuticos en el medio ambiente. Sin embargo, en vista de la diversidad de productos farmacéuticos (en propiedades químicas, estructurales, biológicas o toxicológicas), y considerando que estos contaminantes se encuentran como mezclas en el ambiente real, resulta complicado llevar a cabo un proceso de ecofarmacovigilancia riguroso y unitario para todos los productos farmacéuticos. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo estudios que incluyan los posibles efectos combinados derivados de las mezclas de productos farmacéuticos.

Se ha reportado la presencia de fármacos hipolipemiantes (principalmente fibratos y estatinas), a niveles de ng L^{-1} y mg L^{-1} , en aguas residuales, superficiales y subterráneas y, en menor medida, en agua potable. Así mismo, se reportan efectos tóxicos (principalmente alteraciones en el crecimiento y la reproducción) de los reguladores de lípidos en organismos acuáticos como: cianobacterias, algas, rotíferos, crustáceos, plantas acuáticas, bivalvos y peces. Estos efectos se derivan de los mecanismos de acción, los fibratos activan los receptores activados por el PPAR, principalmente PPAR α . La activación de PPAR α altera la expresión de los genes que regulan el metabolismo de los lípidos, mientras que las estatinas inhiben específicamente la HMG-CoA reductasa, una enzima que convierte la HMG-CoA en mevalonato, un precursor del colesterol. Las estatinas compiten con HMG-CoA por el sitio activo de la enzima, alterando su conformación e inhibiendo su función.

REFERENCIAS

- Al-Habsi, A. A.; Massarsky, A. y Moon, T. W., 2016. Exposure to gemfibrozil and atorvastatin affects cholesterol metabolism and steroid production in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part-B: Biochemistry and Molecular Biology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.11.009>
- Andreozzi, R.; Marotta, R.; y Paxéus, N., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* [on line]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00769-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00769-5)
- Babin, P. J. y Vernier, J., 1989. No Title. *Journal of Lipid Research*, 30 (4), 467-489.
- Barreto, A.; Luis, L. G.; Soares, A. M. V. M.; Paíga, P.; Santos, L. H. M. L. M.; Delerue Matos, C.; ... Oliveira, M., 2017. Genotoxicity of gemfibrozil in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.05.011>
- Bellés, X.; Martín, D. y Piulachs, M. D., 2005. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annual Review of Entomology* [en línea], 50 (1), 181-199. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130356>
- Blumenthal, R. S., 2000. Statins: Effective antiatherosclerotic therapy. *American Heart Journal* [en línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0002-8703\(00\)90033-4](https://doi.org/10.1016/S0002-8703(00)90033-4)

- Brain, R. A.; Reitsma, T. S.; Lissemore, L. I.; Bestari, K.; Sibley, P. K. y Solomon, K. R., 2006. Herbicidal effects of statin pharmaceuticals in *Lemna gibba*. *Environmental Science and Technology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/es0600274>
- Burg, J. S. y Espenshade, P. J., 2011. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Progress in Lipid Research* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.07.002>
- Buser, H. R.; Müller, M. D. y Theobald, N., 1998. Occurrence of the pharmaceutical drug clofibric acid and the herbicide mecoprop in various Swiss Lakes and in the North Sea. *Environmental Science and Technology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/es9705811>
- Canalizo, E.; Favela, E.; Salas, J.; Gómez, R.; Jara, R.; Torres, L. y Viniegra, A., 2013. Guía de práctica clínica: Diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias. *Revista Médica Mexicana Del Seguro Social*.
- Canesi, L.; Lorusso, L. C.; Ciacci, C.; Betti, M.; Regoli, F.; Poiana, G.; ... Marcomini, A., 2007. Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.085>
- Coimbra, A. M., Peixoto, M. J., Coelho, I., Lacerda, R., Carvalho, A. P., Gesto, M., ... Santos, M. M. (2015). Chronic effects of clofibric acid in zebrafish (*Danio rerio*): A multigenerational study. *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.013>
- Contardo Jara, V.; Lorenz, C.; Pflugmacher, S.; Nützmann, G.; Kloas, W. y Wiegand, C., 2011. Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.07.017>
- Daughton, C. G. (2016). Pharmaceuticals and the Environment (PiE): Evolution and impact of the published literature revealed by bibliometric analysis. *Science of the Total Environment* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.109>
- Du, Z. Y.; Clouet, P.; Degrace, P.; Zheng, W. H.; Frøyland, L.; Tian, L. X. y Liu, Y. J., 2008. Hypolipidaemic effects of fenofibrate and fasting in the herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed a high-fat diet. *British Journal of Nutrition* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1017/S0007114508986840>

- Eisa-Beygi, S.; Hatch, G.; Noble, S.; Ekker, M. y Moon, T. W. (2013). The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) pathway regulates developmental cerebral-vascular stability via prenylation-dependent signalling pathway. *Developmental Biology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.11.024>
- Ellesat, K. S.; Holth, T. F.; Wojewodzcic, M. W. y Hylland, K., 2012. Atorvastatin up-regulate toxicologically relevant genes in rainbow trout gills. *Ecotoxicology* [on line]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0918-z>
- Ellesat, K. S.; Tollefsen, K. E.; Åsberg, A.; Thomas, K. V. y Hylland, K., 2010. Cytotoxicity of atorvastatin and simvastatin on primary rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Toxicology in Vitro* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.06.006>
- European Commission., 2003. *Technical guidance document on risk assessment. European Chemicals Bureau.*
- Evans, M. y Rees, A., 2002. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on skeletal muscle: Are all statins the same? *Drug Safety* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.2165/00002018-200225090-00004>
- Fent, K.; Weston, A. A. y Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Ferrari, B.; Paxéus, N.; Giudice, R. Lo; Pollio, A. y Garric, J., 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [en línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00082-9)
- Fujino, H.; Saito, T.; Tsunenari, Y.; Kojima, J. y Sakaeda, T., 2004. Metabolic properties of the acid and lactone forms of HMG-CoA reductase inhibitors. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/00498250400015319>
- Gao, P.; Ding, Y.; Li, H. y Xagorarakis, I., 2012. Occurrence of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant: Mass balance and removal processes. *Chemosphere* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.017>
- Garrison, A. W.; Pope, J. D. y Allen, F. R., 1976. GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters. In *Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water.*
- Gjini, E.; Hekking, L. H.; Kuchler, A.; Saharinen, P.; Wienholds, E.; Post, J. A.; ... Schulte-Merker, S., 2011. Zebrafish Tie-2 shares a redundant role with Tie-1 in heart development and regulates vessel integrity. *Disease Models y Mechanisms* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1242/dmm.005033>

- Gracia-Lor, E.; Sancho, J. V. y Hernández, F., 2011. Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.026>
- Gros, M.; Petrovi, M. y Barceló, D., 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.024>
- Grung, M.; Heimstad, E.; Moe, M.; Schlabach, M.; Svenson, A.; Thomas, K. y Woldegiorgis, A., 2007. *Human and veterinary pharmaceuticals, narcotics, and personal care products in the environment. Swedish Environmental Research Institute* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1139/m88-128>
- Heberer, T. y Stan, H. J., 1997. Determination of Clofibric Acid and N-(Phenylsulfonyl)-Sarcosine in Sewage, River and Drinking Water. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/03067319708031398>
- Henriques, J. F., Almeida, A. R., Andrade, T., Koba, O., Golovko, O., Soares, A. M. V. M., ... Domingues, I., 2016. Effects of the lipid regulator drug gemfibrozil: A toxicological and behavioral perspective. *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.017>
- Holm, G.; Snape, J. R.; Murray Smith, R.; Talbot, J.; Taylor, D. y Sörme, P., 2013. Implementing ecopharmacovigilance in practice: Challenges and potential opportunities. *Drug Safety* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s40264-013-0049-3>
- Holoshitz, N.; Alsheikh-Ali, A. A. y Karas, R. H., 2008. Relative Safety of Gemfibrozil and Fenofibrate in the Absence of Concomitant Cerivastatin Use. *American Journal of Cardiology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2007.07.057>
- Isidori, M.; Nardelli, A.; Pascarella, L.; Rubino, M. y Parrella, A., 2007. Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms. *Environment International* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.01.006>
- KeRNAey, A. S., Crawford, L. F., Mehta, S. C., y Radebaugh, G. W. (1993). The Interconversion Kinetics, Equilibrium, and Solubilities of the Lactone and Hydroxyacid Forms of the HMG-CoA Reductase Inhibitor, CI-981. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists* [on line]. Disponible en: <https://doi.org/10.1023/A:1018923325359>

- Lambropoulou, D. A.; Hernando, M. D.; Konstantinou, I. K.; Thurman, E. M.; Ferrer, I.; Albanis, T. A. y Fernández Alba, A. R., 2008. Identification of photocatalytic degradation products of bezafibrate in TiO₂ aqueous suspensions by liquid and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.030>
- Langford, K. y Thomas, K. V., 2011. Input of selected human pharmaceutical metabolites into the Norwegian aquatic environment. *Journal of Environmental Monitoring* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/c0em00342e>
- Larsson, Å. y Fänge, R., 1977. Cholesterol and free fatty acids (FFA) in the blood of marine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry And* [en línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(77\)90142-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(77)90142-0)
- Laufs, U. y Liao, J. K., 1998. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *The Journal of Biological Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.24266>
- Li, S.; Wagner, C. A.; Friesen, J. A. y Borst, D. W., 2003. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in the lobster mandibular organ: Regulation by the eyestalk. *General and Comparative Endocrinology* [en línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00246-6](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00246-6)
- Lin, A. Y. C. y Reinhard, M., 2005. Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. *Environmental Toxicology and Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1897/04-236R.1>
- Lüllmann, H.; Mohr, K. y Hein, L., 2010. *Farmacología: texto y atlas. Médica Panamericana*.
- Metcalf, C. D.; Koenig, B. G.; Bennie, D. T.; Servos, M.; Ternes, T. A. y Hirsch, R., 2003. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of canadian sewage treatment plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1897/02-469>
- Metcalf, C. D.; Miao, X. S.; Koenig, B. G. y Struger, J., 2003. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1897/02-627>
- Mimeault, C.; Woodhouse, A. J.; Miao, X. S.; Metcalfe, C. D.; Moon, T. W. y Trudeau, V. L., 2005. The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.01.009>

- Murray Smith, R., 2010. Ecopharmacovigilance: a drug company perspective. April 4, 2013. Disponible en: http://isop2010.isoponline.org/uploads/prog/Programme_-3rd_-_7th_November-.pdf
- Neuparth, T.; Martins, C.; Santos, C. B. D. los; Costa, M. H.; Martins, I.; Costa, P. M. y Santos, M. M., 2014. Hypocholesterolaemic pharmaceutical simvastatin disrupts reproduction and population growth of the amphipod *Gammarus locusta* at the ng/L range. *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.009>
- Nödler, K., Voutsas, D., y Licha, T., 2014. Polar organic micropollutants in the coastal environment of different marine systems. *Marine Pollution Bulletin* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.024>
- Owen, S. F., Huggett, D. B., Hutchinson, T. H., Hetheridge, M. J., McCormack, P., Kinter, L. B., ... Sumpter, J. P., 2010. The value of repeating studies and multiple controls: Replicated 28-day growth studies of rainbow trout exposed to clofibric acid. *Environmental Toxicology and Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/etc.351>
- Quinn, B., Gagné, F., y Blaise, C., 2008. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of the Total Environment* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.08.038>
- Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J., y Mothersill, C., 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.10.007>
- Quinn, B., Schmidt, W., O'Rourke, K., y Hernan, R., 2011. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. *Chemosphere* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.033>
- Raldúa, D., André, M., y Babin, P. J., 2008. Clofibrate and gemfibrozil induce an embryonic malabsorption syndrome in zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.11.016>
- Richards, S. M., y Cole, S. E., 2006. A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae. *Ecotoxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0102-4>

- Rocco, L., Frenzilli, G., Fusco, D., Peluso, C., y Stingo, V., 2010. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.032>
- Rodea Palomares, I., Petre, A. L., Boltes, K., Leganés, F., Perdigón-Melón, J. A., Rosal, R., y Fernández-Piñas, F., 2010. Application of the combination index (CI)-isobologram equation to study the toxicological interactions of lipid regulators in two aquatic bioluminescent organisms. *Water Research* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.026>
- Rosal, R., Rodea Palomares, I., Boltes, K., Fernández-Piñas, F., Leganés, F., Gonzalo, S., y Petre, A., 2010. Ecotoxicity assessment of lipid regulators in water and biologically treated wastewater using three aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0137-1>
- Sanderson, H., Johnson, D. J., Wilson, C. J., Brain, R. A., y Solomon, K. R., 2003. Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicology Letters* [en línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00257-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00257-1)
- Saravanan, M., Hur, J. H., Arul, N., y Ramesh, M., 2014. Toxicological effects of clofibrac acid and diclofenac on plasma thyroid hormones of an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* during short and long-term exposures. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.10.013>
- Schmidt, W., O'Rourke, K., Hernan, R., y Quinn, B., 2011. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus* spp.) and their comparison with standardized toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.043>
- Silva, L. J. G., Lino, C. M., Meisel, L., Barceló, D., y Pena, A., 2012. *Ecopharmacovigilance. Handbook of Environmental Chemistry* [en línea]. Disponible en: https://doi.org/10.1007/698_2011_128
- Skolness, S. Y., Durhan, E. J., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Makynen, E. A., Villeneuve, D. L., y Ankley, G. T., 2012. Effects of gemfibrozil on lipid metabolism, steroidogenesis, and reproduction in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/etc.1989>

- Skottheim, I. B., Gedde-Dahl, A., Hejazifar, S., Hoel, K., y Åsberg, A., 2008. Statin induced myotoxicity: The lactone forms are more potent than the acid forms in human skeletal muscle cells in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2007.12.009>
- Staels, B., Dallongeville, J., Auwerx, J., Schoonjans, K., Leitersdorf, E., y Fruchart, J. C., 1998. Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Circulation* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.19.2088>
- Taxe Wuersch, A., De Alencastro, L. F., Grandjean, D., y Tarradellas, J., 2005. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Research* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.03.003>
- Ternes, T. A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* [en línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00099-2)
- Thorpe, J. L., Doitsidou, M., Ho, S. Y., Raz, E. y Farber, S. A., 2004. Germ cell migration in zebrafish is dependent on HMGCoA reductase activity and prenylation. *Developmental Cell* [en línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(04\)00032-2](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(04)00032-2)
- Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S. y Müller, S. R., 2003. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science and Technology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/es025834r>
- Togola, A. y Budzinski, H., 2007. Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1251-x>
- Velasco-Santamaría, Y. M., Korsgaard, B., Madsen, S. S. y Bjerregaard, P., 2011. Bezafibrate, a lipid-lowering pharmaceutical, as a potential endocrine disruptor in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.018>
- Wang, J. y Hu, X., 2014. Ecofarmacovigilancia: Current state, challenges, and opportunities in China. *Indian Journal of Pharmacology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.4103/0253-7613.125158>
- Weston, A., Caminada, D., Galicia, H. y Fent, K., 2009. Effects of lipid-lowering pharmaceuticals bezafibrate and clofibric acid on lipid metabolism in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1897/09-087.1>

- World Health Organization, 2002. *The Importance of Pharmacovigilance-Safety Monitoring of medicinal products*. *Who* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/0470853093>
- Zurita, J. L., Repetto, G., Jos, Á., Salguero, M., López-Artíguez, M. y Cameán, A. M., 2007. Toxicological effects of the lipid regulator gemfibrozil in four aquatic systems. *Aquatic Toxicology* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.11.007>

RETOS ACTUALES DE LA FARMACIA

Retos actuales de la farmacia es un proyecto que está coordinado por Leobardo Manuel Gómez Oliván y un equipo de investigadores que forman parte del claustro de la Facultad de Química en el área de posgrado, ellos han incentivado el espíritu investigador y científico de los estudiantes adscritos al programa para adentrarse en el ámbito farmacéutico.

Los capítulos que conforman esta edición son el reflejo de la actividad académica desarrollada en este posgrado en las diferentes áreas de acentuación que lo conforman: farmacia molecular, farmacia social y tecnología farmacéutica.

SDC

AUTONOMÍA
UAEM
75°
ANIVERSARIO

WATE-D-21-00369 - Submission Confirmation



Traducir mensaje a: Español | No traducir nunca de: Inglés



em.wate.0.7194df.c4e7b558@editorialmanager.com en nombre de
WATE <em@editorialmanager.com >

Jue 25/02/2021 07:49 PM

Para: Leobardo Manuel Gomez Oliván



Dear Dr. Gómez-Oliván,

Thank you for submitting your manuscript,
"Developmental effects of amoxicillin at environmentally relevant concentration using zebrafish embryotoxicity test (ZET)", to **Water, Air, & Soil Pollution**

The submission id is: **WATE-D-21-00369**
Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript.

Your username is: lmgomezo

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/wate/>.

If your manuscript is accepted for publication in **Water, Air, & Soil Pollution**, you may elect to submit it to the Open Choice program. For information about the Open Choice program, please access the following URL: <http://www.springer.com/openchoice>

Alternatively, please call us at 001-630-468-7784 (outside the US)/(630)-468-7784 (within the US) anytime from Monday to Friday.
Thank you very much.

With kind regards,

Journals Editorial Office **WATE**
Springer
P.O. Box 990
3300 AZ DORDRECHT
The Netherlands

Water, Air, & Soil Pollution

Developmental effects of amoxicillin at environmentally relevant concentration using zebrafish embryotoxicity test (ZET)

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:			
Full Title:	Developmental effects of amoxicillin at environmentally relevant concentration using zebrafish embryotoxicity test (ZET)		
Article Type:	Full research paper		
Keywords:	amoxicillin, zebrafish, embryotoxicity, teratogenicity		
Corresponding Author:	Leobardo Manuel Gómez-Oliván, Ph.D. Universidad Autónoma del Estado de México Toluca, México MEXICO		
Corresponding Author's Institution:	Universidad Autónoma del Estado de México		
First Author:	Edgar David González-González, MSci		
Order of Authors:	Edgar David González-González, MSci Leobardo Manuel Gómez-Oliván, Ph.D. Hariz Islas-Flores, PhD Marcela Galar-Martínez		
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (300727)</td> <td>MSci Edgar David González-González</td> </tr> </table>	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (300727)	MSci Edgar David González-González
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (300727)	MSci Edgar David González-González		
Abstract:	<p>Amoxicillin (AMX) is an antibiotic that has been added to the watch list of substances by European Union, through the Water Framework Directive (WFD; 2000/60/EC) and its daughter regulation (Decision 2018/840) for which monitoring data have to be gathered with a possibility for future regulation. Previous studies have demonstrated that this antibiotic generates toxic effects, amongst which oxidative stress in aquatic organisms, is noteworthy. The aim of this study was to evaluate the effect on embryonic development and the teratogenic effects induced by AMX at environmentally relevant concentrations in oocytes and embryos of <i>Danio rerio</i>. Furthermore, oxidative stress biomarkers were evaluated at 72 and 96 hpf. The LC 50 was 14.192 mgL⁻¹, EC 50 was 7.083 mgL⁻¹ and TI was 2.003. Biomarkers of cellular oxidation and antioxidant enzymes were modified in a concentration-dependent way with respect to the control group ($p < 0.05$). The main malformations identified were tail malformation, pericardial edema, yolk sac malformation, scoliosis, pectoral fin absence and no hatching. The results allow us to conclude that AMX at environmentally relevant concentrations is capable of inducing embryotoxic, teratogenic effects, and oxidative damage. This compound represents a risk to aquatic organisms such as <i>Danio rerio</i>.</p>		
Additional Information:			
Question	Response		
<p>***PLEASE READ THIS ALERT BEFORE YOU BEGIN***</p> <p>Water, Air and Soil Pollution will not tolerate unethical submission and/or attempted publication practices. This applies to all authors listed on the articles. We have both plagiarism-detection software and other methods to detect such practices to ensure the highest</p>	YES		

<p>publication standards. Serious consequences, including Informing the author's institution, may result from unethical behaviour. If you require more information about what constitutes unethical behaviour, including what constitutes plagiarism, please see the journal's author instructions on the journal's homepage before you submit to the journal. If you have read and understood this alert, please indicate YES in the response box.</p>	
<p>Have you read the 'Letter from the Editor-in-Chief' and the full journal author instructions, located at the journal homepage www.springer.com/11270?</p>	Yes
<p>Has this material (or data) been literally or substantially submitted (or will it be) for simultaneous consideration in another publication in English or another language? If Yes, do not continue with the submission.</p>	No
<p>Has this material (or data) been literally or substantially published elsewhere in English or another language? If Yes, do not continue with the submission.</p>	No
<p>Once the article is submitted for review, no changes in authorship, the order of authors, or designation of the corresponding author will be permitted.</p> <p>Have all authors been actively involved in making a substantial scholarly contribution to the design and completion of this research, interpretation of data and conclusions, assisted in drafting and revising the manuscript, and read and approved this submission? (YES/NO). If NO, please do not submit your manuscript. Please review the authorship guidelines on the journal's homepage for guidance.</p>	Yes
<p>Does the article report existing science applied to a local situation?</p>	No
<p>If yes, how is this research significant to furthering worldwide knowledge on this topic</p>	NO
<p>Is the article of local, national or international value? (Choose one.)</p>	International

<p>Please provide the name, affiliation and address, and e-mail address of three potential reviewers who do not pose a conflict of interest. Note that this information will be checked to ensure it is credible. If you do not enter the information here, your manuscript will not be sent out for review and will be returned to you, therefore increasing the time to process your manuscript.</p>	<p>Karl Fent School of Life Sciences, University of Applied Sciences and Arts Northwestern Switzerland karl.fent@fhnw.ch</p> <p>Mehmet Şahin mehmet.sahin@simon.rochester.edu Department of Industrial Engineering, Iskenderun Technical University,</p> <p>Inger Porsch Hällström School of Life Sciences, Södertörn University inger.porsch-hallstrom@sh.se</p>
<p>Are you submitting to a Special Issue?</p>	<p>No</p>
<p>Suggested Reviewers:</p>	<p>Mehmet Şahin Researcher, Iskenderun Technical University: Iskenderun Teknik Universitesi mehmet.sahin@simon.rochester.edu</p> <p>Karl Fent Researcher, University of Applied Sciences and Arts Northwestern Switzerland: Fachhochschule Nordwestschweiz karl.fent@fhnw.ch</p> <p>Inger Porsch Hällström Reseracher, Södertörn University College Library: Sodertorns hogskolebibliotek inger.porsch-hallstrom@sh.se</p>

[Click here to view linked References](#)



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Química

February 25, 2021

Jack T. Trevors, PhD

Editor-in-Chief

Water, Air & Soil Pollution

Dear colleague:

I am enclosing herewith a manuscript entitled “**Developmental effects of amoxicillin at environmentally relevant concentration using zebrafish embryotoxicity test (ZET)**” submitted to *Water, Air & Soil Pollution* for possible evaluation. The authors have read and approved the manuscript.

With the submission of this manuscript, I would like to confirm that the above-mentioned manuscript has not been published elsewhere, accepted for publication elsewhere or under editorial review for publication elsewhere; and that my Institute’s Universidad Autónoma del Estado de México representative is fully aware of this submission.

Thanking you in advance for your attention, I remain,

Sincerely yours,



Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván

Laboratorio de Toxicología Ambiental

Facultad de Química

Universidad Autónoma del Estado de México

Fax: (+52 722) 2173890

E-mail: lmgomezo@uaemex.mx, lgolivan74@gmail.com

[Click here to view linked References](#)

1 **Developmental effects of amoxicillin at environmentally relevant concentration using**
2 **zebrafish embryotoxicity test (ZET)**

3

4 Edgar David González-González^a, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{a,*}, Hariz Islas-Flores^a,

5 Marcela Galar-Martínez^b

6

7

8 ¹ Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.
9 Paseo Colón intersección Paseo Tollocan, Colonia Residencial Colón, CP 50120, Toluca, Estado de México,
10 México.

11 ² Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,
12 Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido Massieu s/n y cerrada
13 Manuel Stampa, Col. Industrial Vallejo, Ciudad de México, CP, 07700, México.

14

15 *Corresponding author:

16 Dr. Leobardo Manuel Gómez-Oliván (<https://orcid.org/0000-0002-7248-3449>)

17 Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.

18 Paseo Colón intersección Paseo Tollocan, Colonia Residencial Colón, CP 50120, Toluca, Estado de México,

19 México. Telephone +(52) 7222173890; fax +(52) 7222173890. E-mail: imgomezo@uaemex.mx;

20 lgolivan74@gmail.com

21

22

23

24 Dra. Hariz Islas Flores (<https://orcid.org/0000-0002-0614-4860>)

25 Dra. Marcela Galar Martínez (<https://orcid.org/0000-0003-1027-8017>)

26 Dr. Leobardo Manuel Gómez-Oliván (<https://orcid.org/0000-0002-7248-3449>)

27

28

29

30 **Abstract**

31

32 Amoxicillin (AMX) is an antibiotic that has been added to the watch list of substances by European Union,
33 through the Water Framework Directive (WFD; 2000/60/EC) and its daughter regulation (Decision 2018/840)
34 for which monitoring data have to be gathered with a possibility for future regulation. Previous studies have
35 demonstrated that this antibiotic generates toxic effects, amongst which oxidative stress in aquatic organisms,
36 is noteworthy. The aim of this study was to evaluate the effect on embryonic development and the teratogenic
37 effects induced by AMX at environmentally relevant concentrations in oocytes and embryos of *Danio rerio*.
38 Furthermore, oxidative stress biomarkers were evaluated at 72 and 96 hpf. The LC_{50} was $14.192 \mu\text{gL}^{-1}$, EC_{50}
39 was $7.083 \mu\text{gL}^{-1}$ and TI was 2.003. Biomarkers of cellular oxidation and antioxidant enzymes were modified in
40 a concentration-dependent way with respect to the control group ($p < 0.05$). The main malformations identified
41 were tail malformation, pericardial edema, yolk sac malformation, scoliosis, pectoral fin absence and no
42 hatching. The results allow us to conclude that AMX at environmentally relevant concentrations is capable of
43 inducing embryotoxic, teratogenic effects, and oxidative damage. This compound represents a risk to aquatic
44 organisms such as *Danio rerio*.

45

46 **Keywords:** amoxicillin, zebrafish, embryotoxicity, teratogenicity

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57 **Declarations**

58 **Data Availability:** All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

59 **Ethical Approval:** The study was approved by Ethics and Research Committee of the Universidad Autónoma
60 del Estado de México, Toluca, Mexico (Approval ID: CEI.UAEMCQ.REC.132.2020).

61 **Consent to Participate (Ethics):** Not applicable.

62 **Consent to Publish (Ethics):** All the authors have the consent to publish the data

63 **Plant Reproducibility:** Not applicable.

64 **Clinical Trials Registration:** Not applicable.

65 **Author Contribution:** Edgar David González-González and Leobardo Manuel Gómez-Oliván performed all
66 the exposure experiments.

67 Leobardo Manuel Gómez-Oliván and Edgar David González-González were involved in the conception.

68 Leobardo Manuel Gómez-Oliván, Edgar David González-González and Hariz Islas-Flores were involved in the
69 design and interpretation of the data and the writing of the manuscript with input from Marcela Galar-Martínez.

70 **Conflict of Interest:** The authors declare that they have no financial interests or personal relationships that may
71 have influenced the work reported in this document.

72 **Funding:** This study was made possible by financial support from the Consejo Nacional de Ciencia y
73 Tecnología (CONACyT, Project 300727).

74

75 **Compliance with Ethical Standards**

76 **Disclosure of potential conflicts of interest:** The authors declare that they have no known competing financial
77 interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

78 **Research involving human participants and/or animals:** In this project we worked with animals (zebra fish),
79 following the protocols established by the Ethics and Research Committee of the Universidad Autónoma del
80 Estado de México.

81 **Informed consent:** Not applicable.

82

83

84

85 1. Introduction

86

87 In the last few years there has been growing concern about the release of organic compounds of anthropogenic
88 origin, known as emerging organic contaminants (EOCs), to the environment. These EOCs include a diverse
89 group of thousands of chemical compounds, such as pharmaceuticals, personal care products (PPCPs),
90 pesticides, hormones, surfactants, flame retardants, plasticizers, and industrial additives, among others.
91 Metabolites and intermediate degradation products of parent compounds are also included (Farré et al., 2008).

92 The major concern about these compounds is their impact on the water sources. In the case of pharmaceuticals,
93 even very low amounts can exhibit undesirable effects in non-target species. This is especially true for
94 pharmacological classes such as antibiotics and hormones (Naidu et al., 2016).

95 Antibiotics are widely used for human and veterinary therapies, but in recent decades they have been used in
96 ever increasing quantities (Danner et al., 2019; Wang et al, 2020). According to a recent World Health
97 Organization (WHO) study, the overall consumption of antibiotics ranged from 4.4 to 64.4 Defined Daily Doses
98 (DDD) per 1000 inhabitants per day. In most countries amoxicillin (AMX) and amoxicillin/clavulanic acid
99 were the most frequently consumed antibiotics (WHO, 2018). Despite their benefits, antibiotics have been
100 recently recognized as environmental pollutants in aquatic environments, due to their potential adverse effects
101 on ecosystem and human health (Manaia, 2017; Wang et al, 2020).

102 Among the antibiotics, AMX is widely consumed worldwide, approximately 29.4% of total DDD in the region
103 of the Americas (WHO, 2018). It is a semi-synthetic penicillin class (β -lactam antibiotics) drug used in the
104 treatment and prevention of bacterial respiratory, gastrointestinal, urinary, and skin infections in humans and
105 animals (Bush, 2003; Rao et al., 2011).

106 During its metabolization, it is excreted 80-90% unchanged from the human body (Hirsch et al., 1998). With
107 its high recommended daily dose ($750\text{--}2250\text{ mg day}^{-1}$) and its resistance to changes in forms during excretion,
108 amoxicillin is expected to be in greater proportion than other PPCPs in the municipal wastewater, in terms of
109 both levels and frequency (Mutiyar & Mittal, 2013).

110 AMX and its degradation products have been detected at concentrations of $10\text{--}3000\text{ ngL}^{-1}$ in wastewater and
111 surface waters (Matsuo et al., 2011; Mutiyar and Mittal, 2013; Palmer et al., 2008; Watkinson et al., 2009), but
112 it is found at lower concentrations in surface and drinking waters, with concentrations not exceeding some ngL^{-1}

113 ¹ [with exception of the 0.2 mgL⁻¹ reported by Watkinson et al. (2009)]. An average amount of 127.49 ngL⁻¹ of
114 AMX in wastewater was reported by Kim et al., (2018). Kasprzyk-Hordern et al., (2007) reported that in
115 hospital and urban effluents, concentrations of this pharmaceutical were of 0.9 and 1.67 µgL⁻¹, respectively; in
116 surface waters, concentrations between 0.039 and 0.0245 µgL⁻¹, were found. Several studies have reported the
117 presence of AMX in urban areas, wastewater, surface water and groundwater (Kümmerer, 2001; Locatelli et
118 al., 2011; Kim et al., 2018). Data from the Curitiba rivers were higher than those reported by Kim et al. (2018)
119 in wastewater (127.49 ngL⁻¹), and by Locatelli et al. (2011) in superficial waters (17 ngL⁻¹). However,
120 amoxicillin concentrations were like wastewater findings in Tanzania up to 11.99 µgL⁻¹ (Kaleva et al., 2008;
121 Ebele et al., 2017)

122 It is well known that the metabolism of AMX has two major products: amoxicilloic acid and amoxicillin
123 piperazine-2,5-dione (DIKETO). These compounds do not display antibiotic activity, however, the amoxicilloic
124 acid could have potential allergic properties (Reyns et al., 2008).

125 AMX has only recently been included in the European Union watch list [through the Water Framework
126 Directive (WFD; 2000/60/EC) and its daughter regulation (Decision 2018/840)] as a target compound for
127 monitoring its risk to the aquatic environment (Loos et al., 2018). The importance of their inclusion lies in the
128 fact that it has been identified as a substance potentially harmful for the aquatic environment but for which
129 monitoring data has not been sufficiently to establish their environmental risk.

130 Growth inhibition measurements on algae have shown the high sensitivity of these organisms to antibiotics with
131 low NOEC, measured at 3.1 µgL⁻¹ for clarithromycin (Yamashita et al., 2006) and at 0.78 µgL⁻¹ for amoxicillin
132 (Andreozzi et al., 2004).

133 Detrimental effects on non-target organisms, including humans and plants, have also been observed (Gomes et
134 al., 2019; Lawrence et al., 1996; Lowes et al., 2009) and aquatic ecosystems are particularly prone to the toxic
135 effects of antibiotics. AMX was toxic (through mortality) to *Tilapia nilotica* fish and to *Culex pepans* mosquito
136 larvae at concentrations up to 10 µgL⁻¹ (Yasser and Nabila, 2015).

137 Previous studies in our research group demonstrate that the AMX generate oxidative stress, genotoxicity and
138 cytotoxicity in *C. carpio* (Elizalde-Velázquez et al., 2017; Orozco-Hernández et al., 2019). Our hypothesis that
139 the AMX is capable to induce alterations to embryonic development and teratogenicity in *D. rerio* is supported
140 by oxidative stress is involved in the etiology of defective embryo development (Guérin et al., 2001).

141 Zebrafish embryos have been used for the ecotoxicological assessment of metals, agrochemicals, and
142 pharmaceuticals, among other chemicals. Several studies suggested that fish embryo toxicity (FET) tests with
143 zebrafish are as sensitive as a toxicity test with adult fish (Lammer et al. 2009). Many advantages of FET can
144 be listed: usage of a low volume of test solutions and, consequently, low volume of wastes; test organisms are
145 easily obtained; in a short period of time, mortality and developmental responses are assessed (de Oliveira et
146 al., 2020).

147 The objective of this study was to evaluate the effect on embryonic development, teratogenic effects and
148 oxidative damage induced by AMX at environmentally relevant concentrations in oocytes and embryos of
149 *Danio rerio*.

150

151 **2. Material and methods**

152 **2.1. Test substance**

153 Amoxicillin trihydrate (6-[2-Amino-2-(4-hydroxyphenyl)-acetyl]amino-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-
154 azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid trihydrate) utilized in the study was purchased from Tokyo
155 Chemical Industry Co., LTD. The purity of the standard was 98%, $C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$. with a molecular weight
156 of 365.40 (CAS number 61336-70-7).

157

158 **2.2. Zebrafish maintenance and breeding**

159 Adult zebrafish of either sex were obtained from a commercial supplier. The breeding fish were housed
160 separately by gender under a natural photoperiod and at a temperature of 27 ± 1 °C. They were fed with
161 commercial flake food until one week before spawning, when this food was changed to *Artemia* sp.

162

163 **2.3. Collection of eggs**

164 The day before eggs were required, males and females were placed in breeding tanks with 3:6 male-female
165 ratio. The breeding tanks were equipped with a spawning tray, which consists of a fine net with an appropriate
166 mesh size for eggs to fall through, close to the bottom of the tank and contained 10 L of tap water with sea salts
167 (1 mL L⁻¹ of Instant Ocean) and anti-chlorine, at 27 ± 1 °C. The fish were left undisturbed overnight, and eggs
168 could be collected on the next morning. Once the eggs were obtained, they were observed at 4× in a stereoscopic

169 microscope and the viable eggs were separated. Only those embryos that were fertilized, not coagulated in
170 blastula stage were used.

171

172 **2.4. Embryo AMX exposure**

173 To evaluate the AMX toxicity to embryonic development alterations and teratogenic effects, the guidelines
174 established by the OECD were followed in their test guideline Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET)
175 Test, 2013. 30 embryos per triplicate were randomly placed in environmentally relevant concentrations (0.039,
176 1.746, 3.453, 5.160, 6.868, 8.575, 10.282 and 11.990 μgL^{-1}) and in a control system, drug free. Exposures were
177 performed in 24-well plates using 2 mL of drug solution, and medium was not exchanged during the experiment.
178 Dead embryos, identified as coagulated eggs or heart beating absence, were removed every 24 h. The plates
179 were maintained at a temperature of 27 ± 1 °C and during natural light-dark photoperiods. At 96 hpf, surviving
180 and dead embryos were counted, and percentage of mortality calculated. Percentages were used to establish a
181 dose-mortality curve and to calculate median lethal concentration (LC_{50}).

182

183 **2.5. Evaluation of developmental effects**

184 Embryonic development was examined at selected time points, namely 12, 24, 48, 72 and 96 hpf, morphological
185 characteristics of the embryos were evaluated using a stereomicroscope. This evaluation was performed in each
186 organism when compared with the reference embryo, according to Kimmel et al. (1995). Each embryo received
187 a score for each of the factors to be evaluated, which are the following: tail development, eye development,
188 somite formation, movement, heartbeat, blood circulation, head-body pigmentation, tail pigmentation,
189 appearance of pectoral fin, buccal bump and hatching; for each abnormality or delay presented in any of the
190 characteristics to be evaluated, one unit was subtracted from the score Hermsen et al. (2011). Six different
191 categories of abnormalities were recorded including: pericardial edema, yolk sac malformation, tail
192 malformation, scoliosis, pectoral fin absence and no hatching. Those most representative deformities were
193 photographed for later description.

194

195

196

197 **2.6. Calculating of the teratogenicity index (TI)**

198 To characterize the teratogenic potential of the test substance (AMX), the teratogenicity index (TI) which was
199 defined as the quotient of LC_{50} and EC_{50m} was calculated. If the TI was > 1 , AMX was considered as teratogenic
200 and if it was < 1 as embryolethal, according to criteria of (Weigt et al., 2011).

201

202 **2.7. Evaluation of oxidative stress**

203 One gram of *Danio rerio* eggs were exposed to AMX environmentally relevant concentrations (0.039, 1.746,
204 3.453, 5.160, 6.868, 8.575, 10.282 and 11.990 μgL^{-1}) in systems prepared using six liters of water added with
205 the antibiotic, and a control. After 72 and 96 h, the embryos were homogenized in 1.5 mL of phosphate buffer
206 (PBS) at pH 7.4. Samples were centrifuged at 15,000 g for 15 min at 4 °C. Cell oxidation biomarkers were
207 determined: lipoperoxidation level (Buege and Aust, 1978), hydroperoxide content (Jiang et al., 1992), and
208 activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (Misra and Fridovich, 1972) and catalase (Radi et al.,
209 1991). The experiments were replicated fivefold.

210

211 **2.8. Statistical analyses**

212 Median lethal concentration (LC_{50}) and median effective concentration of malformation (EC_{50m}) were
213 calculated using IBM SPSS Statics 26. Embryotoxicity and teratogenicity were analyzed using one way analysis
214 of variance (ANOVA), followed by Fisher's LSD test. Significance was accepted when $p < 0.05$, using StatPlus
215 6.2.2.0. The validity criteria used in this study were principal two, the first was that the fertilization rate was \geq
216 90%, and the second was that the test was considered valid if the control groups showed no $> 10\%$ of lethal
217 teratogenic effects at 96 hpf.

218 Oxidative stress biomarkers were examined using one way analysis of variance (ANOVA), followed by Fisher's
219 LSD test with 95% confidence limit to determine differences between means. StatPlus 6.2.2.0 was used.

220

221 **3. Results**

222

223 **3.1. Embryolethality and teratogenicity data induced by AMX**

224 **Table 1** shows the data on the percentages of mortality and malformations of the *D. rerio* embryos exposed to
225 the different environmentally relevant concentrations of AMX. The number of dead and malformed embryos
226 increase proportionally with the increase in concentration. The LC₅₀ value was 14.192 µg L⁻¹ with confidence
227 intervals to 95% of [10.902-28.897] and the EC_{50m} was 7.083 µg L⁻¹ with confidence intervals to 95% [5.051-
228 8.658]. With these data the teratogenic index that was 2.003 was calculated. Weigt et al., 2011 established that
229 if the TI of a given substance is greater than 1, the substance is teratogenic and if the TI is below 1, the substance
230 produces mainly embryolethal effects. According to these criteria, AMX was classified as teratogenic.

231

232 **Figure 1** shows mortality increase for concentrations from 0.039 µg L⁻¹ to 11.990 µg L⁻¹, reaching 26.7% and
233 58.9%, respectively. Mortality was identified by embryonic coagulation and a missing heartbeat.

234

235 In addition, **Figure 2** indicates that as the concentration of AMX increases, the malformation rate also increases
236 while the survival rate decreases. Malformations were observed in all the treatment groups during the exposure
237 period in concentration dependent relation. Some embryos survived even with malformations.

238

239 In **Figure 3**, normal, dead, and malformed embryos are observed in each AMX concentration used in the
240 experiment. From the concentration of 0.039 µg L⁻¹ to 3.453 µg L⁻¹ and from 5.160 µg L⁻¹ to 8.575 µg L⁻¹ the
241 embryos presented a similar number of malformations. The number of normal embryos decreased
242 proportionally as the concentration of AMX. These data are consistent with **Figure 5**, where we can observe
243 that at the highest AMX concentration a higher number of teratogenic alterations were observed.

244

245 **3.2. Malformations of *D. rerio* embryos exposed to AMX**

246 In **Figure 4** shows the averages of the scores obtained by the embryos of *D. rerio* in each of the proven
247 concentrations of AMX. The highest score obtained was in the control since embryos development was normal.
248 As the AMX concentrations increased, the score decreased due to all developmental alterations and teratogenic
249 effects observed ($p < 0.05$). All decreases were statistically significant with respect to the control score and at
250 all exposure times.

251

252 **Figure 5** illustrates the frequency of the teratogenic alterations observed in the embryos and larvae of *D. rerio*
253 exposed to the different proportions of the industrial effluent. The most frequent were tail malformation,
254 pericardial edema, yolk sac malformation, scoliosis, pectoral fin absence and no hatching (Table 2). The highest
255 concentrations of AMX 10.282 μgL^{-1} and 11.990 μgL^{-1} showed approximately 30-31% pectoral fin absence
256 and 37-39% no hatching. In contrast, the lower concentrations of AMX 0.039 μgL^{-1} and 1.746 μgL^{-1} showed
257 approximately 7-10% pectoral fin absence and 14-16% no hatching.

258

259 **3.3. Oxidative damage and antioxidant defenses induced by AMX in *D. rerio* embryos**

260 **Figures 6 and 7** shows the biomarkers of cell oxidation and antioxidation at 72 and 96 hpf. As can be seen, the
261 values of all biomarkers were increased with respect to the control group and the exposure time in a statistically
262 significant manner, and concentration dependent in *D. rerio* embryos. Increases of up to approximately 88%
263 (at 72 hpf) and 58% (at 96 hpf) were observed for the hydroperoxides content (HPC), 48% (at 72 hpf) and 49%
264 (at 96 hpf) for the lipoperoxidation level (LPX) with respect to the control groups ($p < 0.05$). In the case of
265 antioxidant activity, increases of up to 105% (at 72 hpf), 153% (at 96 hpf) and 541% (at 72 hpf) and 180% (at
266 96 hpf) were observed in the activities of the superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes relative
267 to the control group ($p < 0.05$). These increases were time and concentration dependent in all cases.

268

269 **4. Discussion**

270 Antibiotics are biologically active and can inhibit the synthesis of proteins, nucleic acids, and cell walls (Faghieh
271 et al., 2017; Ma et al., 2016) and can also inhibit DNA replication and cell division (Sass and Brotz-Oesterhelt,
272 2013; van Eijk et al., 2017). Antibiotics are not completely removed after wastewater sewage treatment, and
273 therefore aquatic environments are continuously exposed (Sinthuchai et al., 2016; Straub et al., 2012). Low
274 concentrations of antibiotics cause non-target toxicity to aquatic organisms, but the effects in fish are less often
275 reported than in microorganisms (Fent et al., 2006; Santos et al., 2010).

276 In the aquatic environment, few studies have reported the effects of AMX in fish, probably because it is not
277 described as highly toxic in scientific literature (AMX 96h-LC₅₀ = 1000 mgL⁻¹ for *Oryzias latipes* according to
278 Park and Choi, (2008). In a study made for Oliveira et al., (2013) AMX caused premature hatching (48h-EC₅₀

279 = 132.4 mgL⁻¹) and embryos of zebrafish presented abnormal development. The most frequent malformations
280 were edemas and tail deformities.

281 In this study we decided to work with AMX at environmentally relevant concentrations (0.039 to 11.990 µgL⁻¹)
282 since these are present in bodies of water and these are the indication of the presence of this antibiotic in the
283 world. Our study shows that exposure to AMX for 96 h induces pectoral fin absence and no hatching (EC_{50m} =
284 7.083 µgL⁻¹), like most frequent malformations.

285 Inhibition hatching was already described to kanamycin and a mixture of β-diketone antibiotics (Song et al.,
286 2010; Wang et al., 2013). The hatching process is based on a combination of chemical, osmotic, and mechanical
287 (muscular) mechanism (Denucé, 1985; Yamagani, 1988). Different toxic mechanisms could justify hatching
288 delay in fish embryos results from inhibition of the hatching enzyme chorionase, osmotic disturbances
289 interfering with the activity of the hatching enzyme and/or inability of the emerging larvae to break the egg
290 shell (Dave and Xiu, 1991; Hallare et al., 2005).

291 Other malformations observed were tail malformation, pericardial edema, yolk sac malformation and scoliosis.
292 In zebrafish, the heart is the first organ to develop and function; hence, it appears to be a primary target for
293 developmental toxicity. The occurrence of pericardial edema is an indicator of abnormal cardiac development
294 (Hill et al., 2005). Pericardial edema may also be an indicator of osmotic or metabolic dysfunction (Hill et al.,
295 2004). Some results suggest that yolk sac edema can inhibit the supply of nutrients to the heart, resulting in
296 pericardial edema (Mu et al., 2013).

297 Spine deformities (such as scoliosis) might be the consequence of dysregulated Wnt signaling or decreased
298 collagen in the spine column (Çelik et al., 2012). Spine deformities might also be linked to calcium and
299 phosphorus ion depletion or deregulation, which are necessary for the normal development of zebrafish
300 (Muramoto, 1981).

301 In summary, these results demonstrate that AMX interferes with the normal development. It could be because
302 AMX by acting as a hapten, leads to the activation of T-cell clones against penicillin-specific immunoglobulins,
303 which bind to AMX antigens forming complexes that activate the immunoallergic response (Kormoczi et al.,
304 2001; Aldini et al., 2006, 2008; Oetl and Stauber, 2007). Immune cell function is related to reactive oxygen
305 species (ROS) production, but excessive amounts of ROS can become a source of tissue damage by attacking
306 different cellular components and causing cell death by oxidative stress (Aderem and Underhill, 1999).

307 Teratogenic effects on the spine, tail, yolk sac, and heart were observed at concentrations lower than those
308 causing lethality, indicating that AMX is a teratogen.

309 Several bactericidal agents, such as β -lactams, quinolones, and aminoglycosides, can induce ROS generation,
310 which are highly damaging molecules that can inhibit most functions of oxygen-respiring cells (Kohanski et
311 al., 2010).

312 The generation of oxidative stress induced by AMX, demonstrated by some authors, can alter the integrity of
313 biomolecules such as lipids, proteins, and DNA, as well as being associated with disorders in organisms which
314 could affect fertility, health, and the life cycle of fish, as has been demonstrated by Theodorakis et al. (2000),
315 and provoking genotoxicity (Anlas and Ustuner, 2016) and cytotoxicity.

316 There is evidence that oxygen plays a key role in the metabolism of embryos and is critical in early embryonic
317 development. Reactive oxygen species (ROS) have vital signaling functions and intervene in numerous
318 physiological processes in the developing organism. During embryogenesis, ROS control cell division and the
319 maturing of oocytes as well as the implantation and formation of blastocysts. When ROS are not duly regulated,
320 they tend to generate oxidative stress and consequently embryotoxicity. Therefore, the antioxidant defense
321 plays a vital role in the protection of organisms in formation, since pro-oxidant agents could elevate the
322 concentration of ROS and induce oxidative damage in oocytes, mitochondrial alterations, depletion of the ATP
323 content, DNA damage, lipoperoxidation, apoptosis, and/or a delay in the entire embryonic development process
324 (Pašková et al., 2011).

325 In this study, we corroborated that AMX can induce oxidative stress in zebrafish embryos in a concentration-
326 dependent manner. Moreover, at 72 and 96 hpf, this antibiotic at all concentrations tested was capable to
327 increase the level of cell oxidative biomarkers (LPX and HPC) with respect to the control group ($p < 0.05$).

328 In 2007 a novel mechanism was proposed whereby bactericidal antibiotics (such as β -lactam) induce bacterial
329 cell death. This mechanism involves the production of hydroxyl radicals and was reported to depend on
330 metabolism-related NADH depletion, the tricarboxylic acid (TCA) cycle, the electron transport chain, damage
331 of iron sulfur clusters in proteins, and stimulation of the Fenton reaction (Kohanski et al., 2007; Dwyer et al.,
332 2007).

333 Reactive oxygen species (ROS) play a significant role in embryonic development. ROS modulate signaling
334 pathways that promote differentiation, proliferation, and apoptosis (Dennery, 2007). Excess ROS lead to

335 oxidative stress and the perturbation of redox-sensitive signaling pathways, some of which are associated with
336 dysmorphogenesis (Ozolins and Hales, 1997). During mid-organogenesis, a period when the embryo is
337 undergoing rapid cellular growth and differentiation leading to major structural changes, ROS may play an
338 important role in mediating teratogenic insult (Schlisser et al., 2010).

339 ROS contributes to embryonic maldevelopment by modifying redox-sensitive signaling pathways critical to
340 development. During organogenesis, oxidative stress post-translationally modified redox-regulated
341 transcription factors with subsequent changes in gene expression in the embryo (Dennerly, 2007).

342 Our results of embryo lethality show that the malformations in the zebrafish embryos were more frequent at
343 higher concentrations of AMX.

344 Two recent studies carried out by our group demonstrated that, 1) AMX at concentrations of 10 ngL^{-1} and 10
345 μgL^{-1} generated an increase in the levels of lipoperoxidation, hydroperoxide content and carbonylated protein
346 content, as well as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in brain, kidney, and gills of
347 *Cyprinus carpio* (Elizalde-Velázquez et al., 2017), and 2) AMX in environmentally relevant concentrations,
348 $0.039 \mu\text{gL}^{-1}$ y $1.67 \mu\text{gL}^{-1}$, was capable of generating genotoxic alterations and cytotoxic effects in blood cells
349 of the common carp (Orozco-Hernández et al., 2019).

350 The redox stress component of antibiotic lethality is hypothesized to derive from alterations to multiple core
351 aspects of cellular physiology and stress response activation. Specifically, this component includes alterations
352 to central metabolism, cellular respiration, and iron metabolism initiated by drug-mediated disruptions of target-
353 specific processes and resulting cellular damage (Dwyer et al., 2014).

354 Hatching is one of the important steps in embryogenesis (Yumnamcha et al., 2015). Embryo development rate
355 is related to hatching (Dave and Xiu, 1991). These changes in hatching rate may be due to the toxic effect by
356 ROS generate in the chorion. We think that this is related to the inhibition of important enzymes in the hatching
357 process such as chorionase (Haendel et al., 2004).

358 ROS increases the oxidation of polyunsaturated fatty acids (Blahova et al., 2013). LPX has increased depend
359 on AMX concentration. The results show that LPX correlates with changes in antioxidant levels (SOD and
360 CAT).

361 Antioxidant enzymes such as SOD and catalase CAT play a vital role in protecting the cells from oxidative
362 stress. In the present study, SOD and CAT activity was found to be dramatically increased in AMX treated
363 embryos than the control.

364 AMX demonstrates toxicity in development. The development of many enzyme activities such as alkaline
365 phosphatase (AKP), acid phosphatase (ACP) and antioxidant response are also affected by antibiotics (Zhou
366 et al., 2018).

367 Increased amount of ROS can cause apoptosis during embryogenesis (Shi and Zhou, 2010; Khazaei and Aghaz,
368 2017). The apoptosis signal was detected as the result of the chemical toxic effect. Continuation of apoptosis
369 signaling leads to lipid peroxidation and cellular death (Fulda et al., 2010; Weinberg et al., 2016).

370 Finally, a greater TI value is associated with a toxic agent that produces wide separations between the
371 malformation and lethality dose-response curves. It is possible to have a toxic agent that causes severe
372 malformations but not mortality; conversely, a potentially developmental toxic chemical can be so lethal that
373 malformations are not observed (Reimers et al., 2004). AMX is a drug classified as pregnancy category B by
374 FDA, but our study showed little greater than 2 of TI value.

375

376 **5. Conclusions**

377 The data obtained in this study ($LC_{50} = 14.192 \mu\text{gL}^{-1}$ and $EC_{50} = 7.083 \mu\text{gL}^{-1}$) showed a teratogenic index of
378 2.003 , showing that AMX is an antibiotic that can generate embryotoxicity and teratogenicity. AMX at
379 environmentally relevant concentrations $0.039\text{-}11.990 \mu\text{gL}^{-1}$ is capable of inducing alterations to embryonic
380 development and teratogenic effects in oocytes and embryos of zebrafish (*Danio rerio*). The main
381 malformations identified were tail malformation, pericardial edema, yolk sac malformation, scoliosis, pectoral
382 fin absence and no hatching. Embryo malformations may be caused by reactive oxygen species-induced
383 oxidative stress. The results allow us to conclude that AMX at environmentally relevant concentrations is
384 capable of inducing embryotoxic and teratogenic effects, this compound represents a risk to aquatic organisms.

385

386 **Acknowledgements**

387 This study was made possible by financial support from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
388 (CONACyT, Project 300727).

389 **6. References**

390

391 Aderem, A., & Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 17,
392 593-623. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>

393 Aga, D. S., Lenczewski, M., Snow, D., Muurinen, J., Brett, S. J., & Wallace, J.S. (2016). Challenges in the
394 measurement of antibiotics and in evaluating their impacts in agroecosystems: a critical review. *J Environ Qual*,
395 45(2), 407-419. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.07.0393>

396 Aldini, G., Gamberoni, L., Orioli, M., Beretta, G., Regazzoni, L., Facino, R. M., & Carini, M. (2006). Mass
397 spectrometric characterization of covalent modification of human serum albumin by 4-hydroxy-*trans*-2-
398 nonenal. *J Mass Spectrom*, 41(9),1149-1161. <https://doi.org/10.1002/jms.1067>

399 Aldini, G., Vistoli, G., Regazzoni, L., Gamberoni, L., Facino, R. M., Yamaguchi, S., Uchida, K., & Carini, M.
400 (2008). Albumin is the main nucleophilic target of human plasma: a protective role against pro-atherogenic
401 electrophilic reactive carbonyl species? *Chem Res Toxicol*, 21(4), 824-835. <https://doi.org/10.1021/tx700349r>

402 Andreozzi, R., Caprio, V., Ciniglia, C., de Champdoré, M., Lo Giudice, R., Marotta, R., & Zuccato, E.(2004).
403 Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity
404 of amoxicillin. *Environ Sci Technol*, 38(24), 6832-6838. <https://doi.org/10.1021/es049509a>

405 Anlas, C., & Ustuner, O. (2016). Genotoxic assessment of amoxicillin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)
406 by comet assay and micronucleus test. *Fresenius Environ Bull*, 25 (12), 5358-5364

407 Blahová, J., Plhalová, L., Hostovský, M., Divišová, L., Dobšíková, R., Mikulíková, I., Štěpánová, S., &
408 Svobodová, Z. (2013). Oxidative stress responses in zebrafish (*Danio rerio*) after subchronic exposure to
409 atrazine. *Food Chem Toxicol*, 61, 82-85. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.041>

410 Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Halling-Sørensen, B., & Tolls, J. (2003). Are veterinary medicines causing
411 environmental risks? *Environ Sci Technol*, 37(15), 286A-294A. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400307>

412 Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52, 302-310.
413 [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)

414 Bush, K. (2003). β -lactam antibiotics: penicillin, and other β -lactam antibiotics. In: Finch RC, Greenwood D,
415 Norrby SR, Whitley RJ. Antibiotic and chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy (8th edition).
416 Philadelphia: Churchill Livingstone; 1000 pp.

417 Çelik, E. S., Kaya, H., & Yılmaz, S. (2012). Effects of phosalone on mineral contents and spinal deformities in
418 common carp (*Cyprinus carpio*, L. 1758). *Turkish J Fish Aquat Sci*, 12, 259-264. <https://doi.org/10.4194/1303->
419 2712-v12_2_10

420 Danner, M.-C., Robertson, A., Behrends, V., & Reiss, J. (2019) Antibiotic pollution in surface fresh waters:
421 occurrence and effects. *Sci Total Environ*, 664(10), 793-804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.406>

422 Dave, G., & Xiu, R. Q. (1991). Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of
423 zebrafish *Brachydanio rerio*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 21(1), 126-134.
424 <https://doi.org/10.1007/BF01055567>

425 Dave, G., & Xiu, R. Q. (1991). Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of
426 zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 21(1), 126-134.
427 <https://doi.org/10.1007/BF01055567>

428 de Oliveira, R. C. S., Oliveira, R., Rodrigues, M. A. C., de Farias, N. O., Sousa-Moura, D., Nunes, N. A.,
429 Andrade, T. S., & Grisolia, C. K. (2020). Lethal and sub-lethal effects of nitrofurantoin on zebrafish early-life
430 stages. *Water Air Soil Pollut*, 231(2), 54. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-4414-4>

431 Dennery, P. A. (2007). Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Res C Embryo*
432 *Today*, 81, 155-162. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20098>

433 Denucé, J. M. (1985). How embryos escape from their envelopes: a new look at the (phylogenetically) old
434 problem of hatching. *Meded Kon Acad Wet Belgie*, 46, 1-30

435 Dwyer, D. J., Belenky, P. A., Yang, J. H., MacDonald, I. C., Martell, J. D., Takahashi, N., Chan, C. T. Y.,
436 Lobritz, M. A., Braff, D., Schwarz, E. G., Ye, J. D., Pati, M., Vercruyssen, M., Ralifo, P. S., Allison, K. R.,
437 Khalil, A. S., Ting, A. Y., Walker, G. C., & Collins, J. J. (2014). Antibiotics induce redox-related physiological
438 alterations as part of their lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(20), E100-E109. [https://doi.org/](https://doi.org/10.1073/pnas.1401876111)
439 10.1073/pnas.1401876111

440 Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., Hayete, B., & Collins, J. J. (2007). Gyrase inhibitors induce an oxidative damage
441 cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol*, 3(1), 3-91. <https://doi.org/10.1038/msb4100135>

442 Ebele, A. J., Abdallah, M. A.-E., & Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in
443 the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, 3(1), 1-16.
444 <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>

445 Elizalde-Velázquez, A., Martínez-Rodríguez, H., Galar-Martínez, M., Dublán-García, O., Islas-Flores, H.,
446 Rodríguez-Flores, J., Castañeda-Peñalvo, G., Lizcano-Sanz, I., & Gómez-Oliván, L. M. (2017). Effect of
447 amoxicillin exposure on brain, gill, liver, and kidney of common carp (*Cyprinus carpio*): the role of amoxicilloic
448 acid. *Environ Toxicol*, 32(4), 1102-1120. <https://doi.org/10.1002/tox.22307>

449 Faghieh, O., Zhang, Z., Ranade, R. M., Gillespie, J. R., Creason, S. A., Huang, W., Shibata, S., Barros-Álvarez,
450 X., Verlinde, C. L. M. J., Hol, W. G. J., Fan, E., & Buckner, F. S. (2017). Development of methionyl-tRNA
451 synthetase inhibitors as antibiotics for Gram-positive bacterial infections. *Antimicrob Agents Chemother*,
452 61(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.00999-17>

453 Farré, M., Pérez, S., Kantiani, L., & Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their
454 metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC*, 27(11), 991–1007.
455 <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.010>

456 Fent, K., Weston, A. A., & Caminada, D. (2016). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol*,
457 76(2), 122-159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>

458 Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., & Samali, A. (2010). Cellular stress responses: cell survival and cell death.
459 *Int J Cell Biol*, 2010, 214074. <https://doi.org/10.1155/2010/214074>

460 Gomes, M. P., Richardi, V. S., Bicalho, E. M., da Rocha, D. C., Navarro-Silva, M. A., Soffiatti, P., Garcia, Q.
461 S., & Sant'Anna-Santos, B. F. (2019). Effects of ciprofloxacin and roundup on seed germination and root
462 development of maize. *Sci Total Environ*, 651(Pt 2), 2671-2678.
463 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.365>

464 Guérin, P., El Mouatassim, S., & Ménézo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen
465 species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, 7(2), 175-189.
466 <https://doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>

467 Haendel, M. A., Tilton, F., Bailey, G. S., & Tanguay, R. L. (2004). Developmental toxicity of the
468 dithiocarbamate pesticide sodium metam in zebrafish. *Toxicol Sci*, 81(2), 390-400.
469 <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh202>

470 Hallare, A. V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.-R., & Triebkorn, R. (2005). Combined effects of
471 temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*)
472 embryos. *J Therm Biol*, 30(1), 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.06.002>

473 Hermsen, S. A. B., van den Brandhof, E.-J., van der Ven, L. T. M., & Piersma, A. H. (2011). Relative
474 embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with
475 their *in vivo* potencies. *Toxicol In Vitro*, 25(3), 745-753. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.005>

476 Hill, A. J., Bello, S. M., Prasch, A. L., Peterson, R. E., & Heideman, W. (2004). Water permeability and TCDD-
477 induced edema in zebrafish early-life stages. *Toxicol Sci*, 78(1), 78-87. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh056>

478 Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for
479 investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci*, 86(1), 6-19. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>

480 Hirsch, R., Ternes, T. A., Haberer, K., Mehlich, A., Ballwanz, F., & Kratz, K.-L. (1998). Determination of
481 antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry.
482 *J Chromatogr A*, 815(2), 213-223. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00335-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00335-5)

483 Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., & Wolff, S. P. (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for
484 detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem*, 202(2), 384-389.
485 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N)

486 Kaseva, M. E., Mwegoha, W. J. S., Kihampa, C., & Matiko, S. (2008). Performance of a waste stabilization
487 pond system treating domestic and hospital wastewater and its implications to the aquatic environment-a case
488 study in Dar es Salaam, Tanzania. *Journal of Building and Land Development*, 15(1-2), 76-88.

489 Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J. (2007). Multi-residue method for the determination of
490 basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra-performance
491 liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1161(1-
492 2), 132-145. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.074>

493 Khazaei, M., & Aghaz, F. (2017). Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during *in vitro*
494 maturation of oocytes. *Int J Fertil Steril*, 11(2), 63-70. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2017.4995>

495 Kim, C., Ryu, H.-D., Chung, E. G., & Kim, Y. (2018). Determination of 18 veterinary antibiotics in
496 environmental water using high-performance liquid chromatography-q-orbitrap combined with on-line solid-
497 phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1084, 158-165.
498 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.03.038>

499 Kohanski, M. A., DePristo, M. A., & Collins, J. J. (2010). Sub-lethal antibiotic treatment leads to multidrug
500 resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell*, 37(3), 311-320.
501 <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.003>

502 Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A common mechanism of
503 cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5), 797-810.
504 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049>

505 Kormoczi, G.F., Wölfel, U. M., Rosenkranz, A. R., Hörl, W. H., Oberbauer, R., & Zlabinger, G. J. (2001).
506 Serum proteins modified by neutrophil-derived oxidants as mediators of neutrophil stimulation. *J Immunol*,
507 167(1), 451-460. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.451>

508 Kümmerer, K. (2001). Emission and biodegradability of pharmaceuticals, contrast media, disinfectants and
509 AOX from hospitals. *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. Berlin: Springer; 271
510 pp.

511 Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., & Braunbeck, Th. (2009). Is the fish
512 embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity
513 test? *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 149(2), 196-209.
514 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>

515 Lawrence, J. W., Claire, D. C., Weissig, V., & Rowe, T. C. (1996). Delayed cytotoxicity and cleavage of
516 mitochondrial DNA in ciprofloxacin-treated mammalian cells. *Mol Pharmacol*, 50(5), 1178-1188

517 Locatelli, M. A. F., Sodr , F. F., & Jardim, W. F. (2011). Determination of antibiotics in Brazilian surface
518 waters using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Arch Environ Contam Toxicol*,
519 60, 385-393. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9550-1>

520 Loos, R., Marinov, D., Sanseverino, I., Napierska, D., & Lettieri, T. (2018). Review of the 1st Watch List under
521 the Water Framework Directive and recommendations for the 2nd Watch List. Luxembourg: Publications
522 Office of the European Union; 268 pp

523 Lowes, D. A., Wallace, C., Murphy, M. P., Webster, N. R., & Galley, H. F. (2009). The mitochondria targeted
524 antioxidant MitoQ protects against fluoroquinolone-induced oxidative stress and mitochondrial membrane
525 damage in human Achilles tendon cells. *Free Radic Res*, 43(3), 323-328.
526 <https://doi.org/10.1080/10715760902736275>

527 Ma, C., Yang, X., & Lewis, P. J. (2016). Bacterial transcription as a target for antibacterial drug development.
528 *Microbiol Mol Biol Rev*, 80(1), 139-160. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00055-15>

529 Majewsky, M., Wagner, D., Delay, M., Bräse, S., Yargeau, V., & Horn, H. (2014) Antibacterial activity of
530 sulfamethoxazole transformation products (TPs): general relevance for sulfonamide TPs modified at the para
531 position. *Chem Res Toxicol*, 27(10), 1821-1828. <https://doi.org/10.1021/tx500267x>

532 Manaia, C. M. (2017). Assessing the risk of antibiotic resistance transmission from the environment to humans:
533 non-direct proportionality between abundance and risk. *Trends Microbiol*, 25(3), 173-181.
534 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.014>

535 Matsuo, H., Sakamoto, H., Arizono, K., & Shinohara, R. (2011). Behavior of pharmaceuticals in waste water
536 treatment plant in Japan. *Bull Environ Contam Toxicol*, 87(1), 31-35. [https://doi.org/10.1007/s00128-011-0299-](https://doi.org/10.1007/s00128-011-0299-7)
537 7

538 Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a
539 simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 247(10), 3170-3175. [https://doi.org/10.1016/S0021-](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45228-9)
540 9258(19)45228-9

541 Mu, X., Pang, S., Sun, X., Gao, J., Chen, J., Chen, X., Li, X., & Wang, C. (2013). Evaluation of acute and
542 developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. *Environ Pollut*, 175, 147-157.
543 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.12.029>

544 Muramoto, S. (1981). Vertebral column damage and decrease of calcium concentration in fish exposed
545 experimentally to cadmium. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 24(2), 125-133.
546 [https://doi.org/10.1016/0143-1471\(81\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0143-1471(81)90074-X)

547 Mutiyar, P. K., & Mittal, A. K. (2013). Occurrences and fate of an antibiotic amoxicillin in extended aeration-
548 based sewage treatment plant in Delhi, India: a case study of emerging pollutant. *Desalin Water Treat*, 51(31-
549 33), 6158–6164. <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.770199>

550 Naidu, R., Arias, E. V. A., Liu, Y., & Jit, J. (2016). Emerging contaminants in the environment: risk-based
551 analysis for better management. *Chemosphere*, 154, 350–357.
552 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.068>

553 Oettl, K., & Stauber, R. E. (2007). Physiological and pathological changes in the redox state of human serum
554 albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol*, 151(5), 580-590.
555 <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707251>

556 Oliveira, R., McDonough, S., Ladewig, J. C. L., Soares A. M. V. M., Nogueira, A. J. A., & Domingues, I.
557 (2013). Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish
558 (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Pharmacol*, 36(3), 903-912. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.019>

559 Orozco-Hernández, J. M., Gómez-Oliván, L. M., Heredia-García, G., Luja-Mondragón, M., Islas-Flores, H.,
560 SanJuan-Reyes, N., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., & Dublán-García, O. (2019). Genotoxic and
561 cytotoxic alterations induced by environmentally-relevant concentrations of amoxicillin in blood cells of
562 *Cyprinus carpio*. *Chemosphere*, 236, 124323. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.054>

563 Ozolins, T. R., & Hales, B. F. (1997). Oxidative stress regulates the expression and activity of transcription
564 factor activator protein-1 in rat conceptus. *J Pharmacol Exp Ther*, 280(2), 1085-1093

565 Palmer, P. M., Wilson, L. R., O'Keefe, P., Sheridan, R., King, T., & Chen, C.-Y. Sources of pharmaceutical
566 pollution in the New York city watershed. *Sci Total Environ*, 394(1), 90-102.
567 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.01.011>

568 Park, S., & Choi, K. (2008). Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic
569 ecosystems. *Ecotoxicology*, 17(6), 526-538. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0209-x>

570 Pašková, V., Hilscherová, K., & Bláha, L. (2011). Teratogenicity and embryotoxicity in aquatic organisms after
571 pesticide exposure and the role of oxidative stress. *Rev Environ Contam Toxicol*, 211, 25-61.
572 https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8011-3_2

573 Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D., & Freeman, B. A. (1991). Detection of catalase
574 in rat heart mitochondria. *J Biol Chem*, 266(32), 22028-22034. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54740-](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54740-2)
575 2

576 Rao, R., Kaur, S. P., & Nanda, S. (2011). Amoxicillin: a broad-spectrum antibiotic. *Int J Pharm Pharm Sci*,
577 3(3), 30-37

578 Reimers, M. J., Flockton, A. R., & Tanguay, R. L. (2004). Ethanol- and acetaldehyde-mediated developmental
579 toxicity in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(6), 769-781.
580 <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.06.012>

581 Reysn, T., Cherlet, M., De Baere, S., De Backer, P., & Croubels, S. (2008). Rapid method for the quantification
582 of amoxicillin and its major metabolites in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry
583 with emphasis on stability issues. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 861(1),108-116.
584 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.11.007>

585 Santos, L. H. M. L. M., Araujo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., & Montenegro M. C. B. S. M.
586 (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J*
587 *Hazard Mater*, 175(1-3), 45-95. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>

588 Sass, P., & Brotz-Oesterhelt, H. (2013). Bacterial cell division as a target for new antibiotics. *Curr Opin*
589 *Microbiol*, 16(5), 522-530. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.006>

590 Schlisser, A. E., Yan, J., & Hales, B. F. (2010). Teratogen-induced oxidative stress targets glyceraldehyde-3-
591 phosphate dehydrogenase in the organogenesis stage mouse embryo. *Toxicol Sci*, 118(2), 686-695.
592 <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq287>

593 Shi, X. J., & Zhou, B. (2010). The role of Nrf2 and MAPK pathways in PFOS-induced oxidative stress in
594 zebrafish embryos. *Toxicol Sci*, 115(2), 391-400. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq066>

595 Sinthuchai, D., Boontanon, S. K., Boontanon, N., & Polprasert, C. (2016). Evaluation of removal efficiency of
596 human antibiotics in wastewater treatment plants in Bangkok, Thailand. *Water Sci Technol*, 73(1), 182-191.
597 <https://doi.org/10.2166/wst.2015.484>

598 Song, C., Gao, N.-Y., & Gao, H.-W. (2010). Transmembrane distribution of kanamycin and chloramphenicol:
599 insights into the cytotoxicity of antibacterial drugs. *Mol BioSyst*, 6(10), 1901-1910.
600 <https://doi.org/10.1039/B921810F>

601 Straub, J. O., Gysel, D., Kastl, U., Klemmer, J., Sonderegger, M., & Studer, M. (2012). Environmental risk
602 assessment for ancillary substances in biotechnological production of pharmaceuticals. *Environ Toxicol Chem*,
603 31, 681-687. <https://doi.org/10.1002/etc.1733>

604 Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, 2013. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals,
605 Section 2. OECD

606 Theodorakis, C. W., Swartz, C. D., Rogers, W. J., Bickham, J. W., Donnelly, K. C., & Adams, S. M. (2000).
607 Relationship between genotoxicity, mutagenicity, and fish community structure in a contaminated stream. *J*
608 *Aquatic Ecosyst Stress Recovery*, 7, 131-143. <https://doi.org/10.1023/A:1009971330138>

609 van Eijk, E., Wittekoek, B., Kuijper, E. J., & Smits, W. K. (2017). DNA replication proteins as potential targets
610 for antimicrobials in drug-resistant bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother*, 72(5), 1275-1284.
611 [https://doi.org/ 10.1093/jac/dkw548](https://doi.org/10.1093/jac/dkw548)

612 Wang, G., Zhou, S., Han, X., Zhang, L., Ding, S., Li, Y., Zhang, D., & Zarin, K. (2020). Occurrence,
613 distribution, and source track of antibiotics and antibiotic resistance genes in the main rivers of Chongqing city,
614 southwest China. *J Hazard Mater*, 389, 122110. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122110>

615 Wang, H., Che, B., Duan, A., Mao, J., Dahlgren, R. A., Zhang, M., Zhang, H., Zeng, A., & Wang, X. (2013).
616 Toxicity evaluation of β -diketone antibiotics on the development of embryo-larval zebrafish (*Danio rerio*).
617 *Environ Toxicol*, 29(10), 1134-1146. <https://doi.org/10.1002/tox.21843>

618 Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W., & Costanzo, S. D. (2009). The occurrence of antibiotics in an
619 urban watershed: from wastewater to drinking water. *Sci Total Environ*, 407(8), 2711-2723.
620 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.059>

621 Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., & Broschard, T. H. (2011). Zebrafish (*Danio rerio*)
622 embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology*, 281(1-3), 25-36.
623 <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.004>

624 Weinberg, J. M., Bienholz, A., & Venkatachalam, M. A. (2016). The role of glycine in regulated cell death.
625 *Cell Mol Life Sci*, 73(11-12), 2285-2308. [https://doi.org/ 10.1007/s00018-016-2201-6](https://doi.org/10.1007/s00018-016-2201-6)

626 World Health Organization (WHO). (2018). WHO report on surveillance of antibiotic consumption 2016-2018
627 early implementation. Switzerland: World Health Organization; 127 pp.

628 Yamagami, K. (1981). Mechanisms of hatching in fish: secretion of hatching enzyme and enzymatic
629 choriolysis. *Amer Zool*, 21(2), 459-471. <https://doi.org/10.1093/icb/21.2.459>

630 Yamashita, N., Yasojima, M., Nakada, N., Miyajima, K., Komori, K., Suzuki, Y., & Tanaka, H. (2006). Effects
631 of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms. *Water Sci Technol*, 53(11), 65-
632 72. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.338>

633 Yasser, E.-N., & Nabila, E. D. (2015). Toxicity of amoxicillin and erythromycin to fish and mosquitoes.
634 *Ecotoxicol Environ Contam*, 10(1), 13-21. <https://doi.org/10.5132/eec.2015.01.03>

635 Yumnamcha, T., Roy, D., Devi, M. D., & Nongthomba, U. (2015). Evaluation of developmental toxicity and
636 apoptotic induction of the aqueous extract of *Millettia pachycarpa* using zebrafish as model organism. *Toxicol*
637 *Environ Chem*, 97(10), 1363-1381. <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1093750>

638 Zhou, L., Limbu, S. M., Shen, M., Zhai, W., Qiao, F., He, A., Du, Z.-Y., & Zhang, M. (2018). Environmental
639 concentrations of antibiotics impair zebrafish gut health. *Environ Pollut*, 235, 245-254.
640 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.073>

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664 **Figure legends**

665

666 **Figure 1.** Mortality of zebrafish embryos exposed to AMX

667

668 **Figure 2.** Survival and malformation rate of zebrafish embryos exposed to AMX

669

670 **Figure 3.** Effects on zebrafish embryos exposed to different AMX concentrations

671

672 **Figure 4.** Concentration-response curves of AMX in *Danio rerio* embryos

673

674 **Figure 5.** Teratogenic malformations induced by exposure to AMX concentrations in *Danio rerio* embryos

675

676 **Figure 6.** Cell oxidative biomarkers, hydroperoxide content (HPC) and lipid peroxidation (LPX) in *Danio rerio*

677 embryos exposed to AMX

678

679 **Figure 7.** Activity of antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in *Danio rerio*

680 embryos exposed to AMX

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691 **Table captions**

692

693 **Table 1.** Mortality and malformation data in embryos of *Danio rerio* exposed to AMX

694

695 **Table 2.** Main malformations in embryos of zebrafish identified by exposure to AMX at different
696 concentrations

697

Figure 1

[Click here to access/download;colour figure;Figure 1.tiff](#)

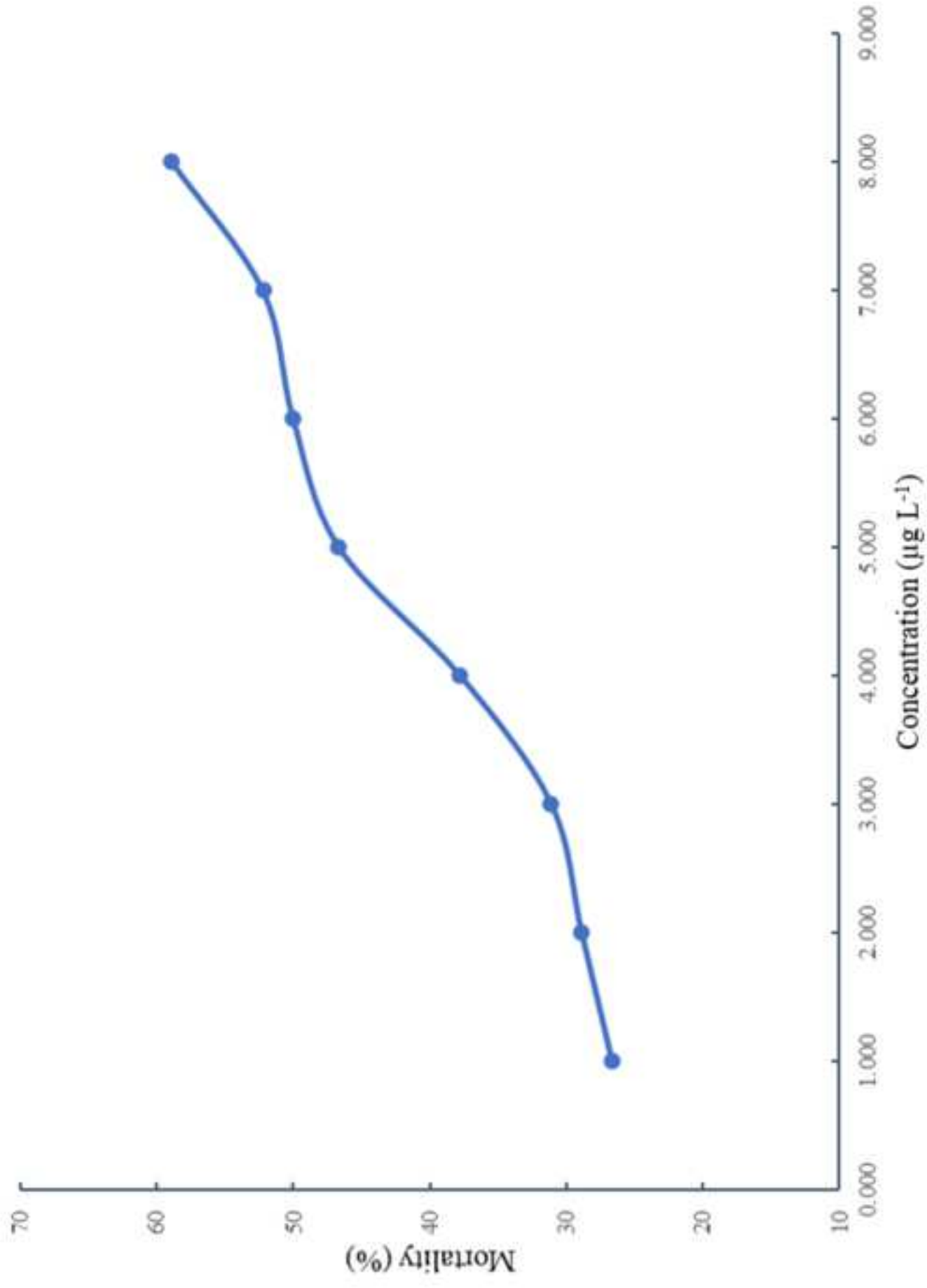


Figure 2

[Click here to access/download;colour figure;Figure 2.tiff](#)

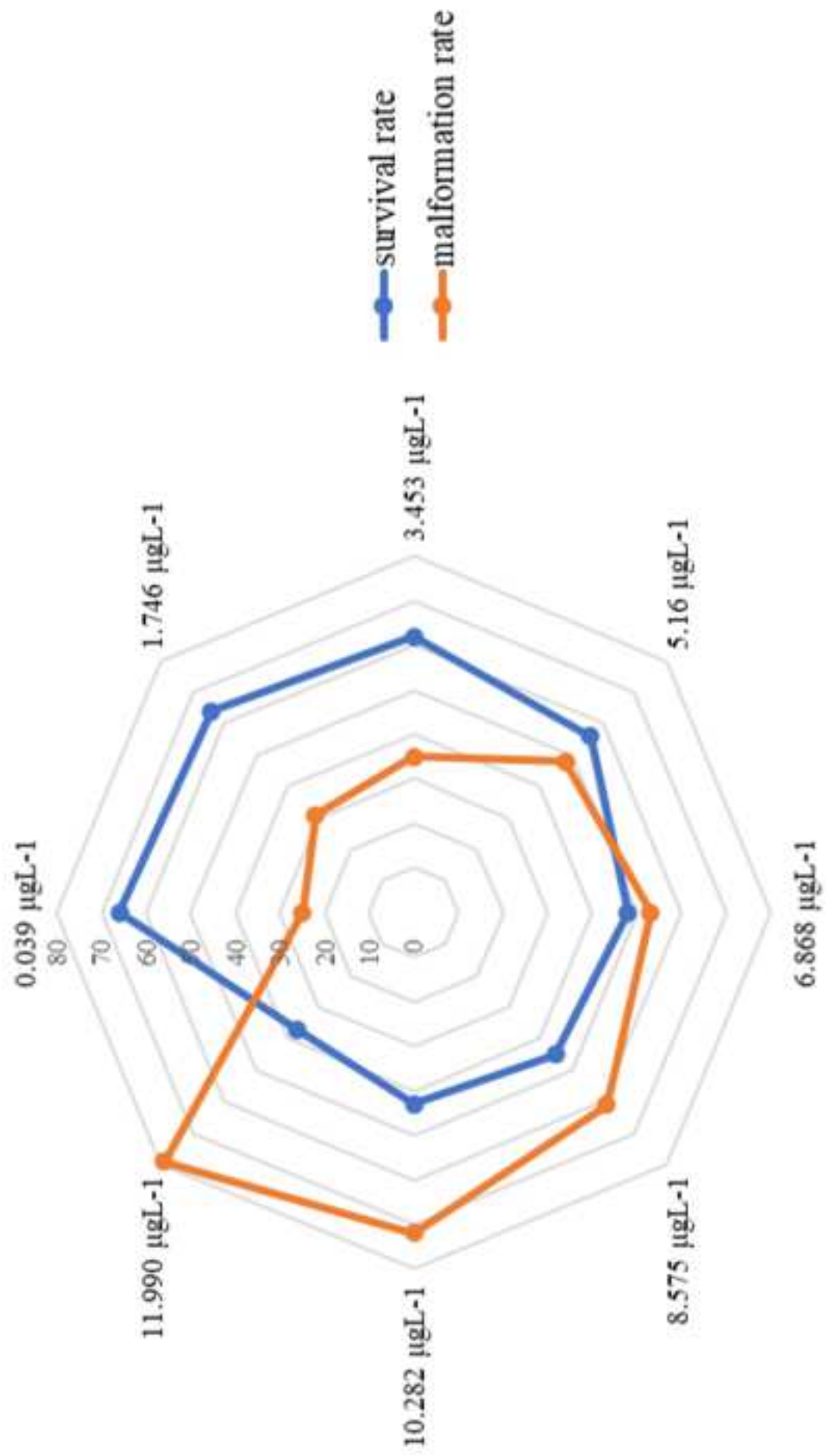
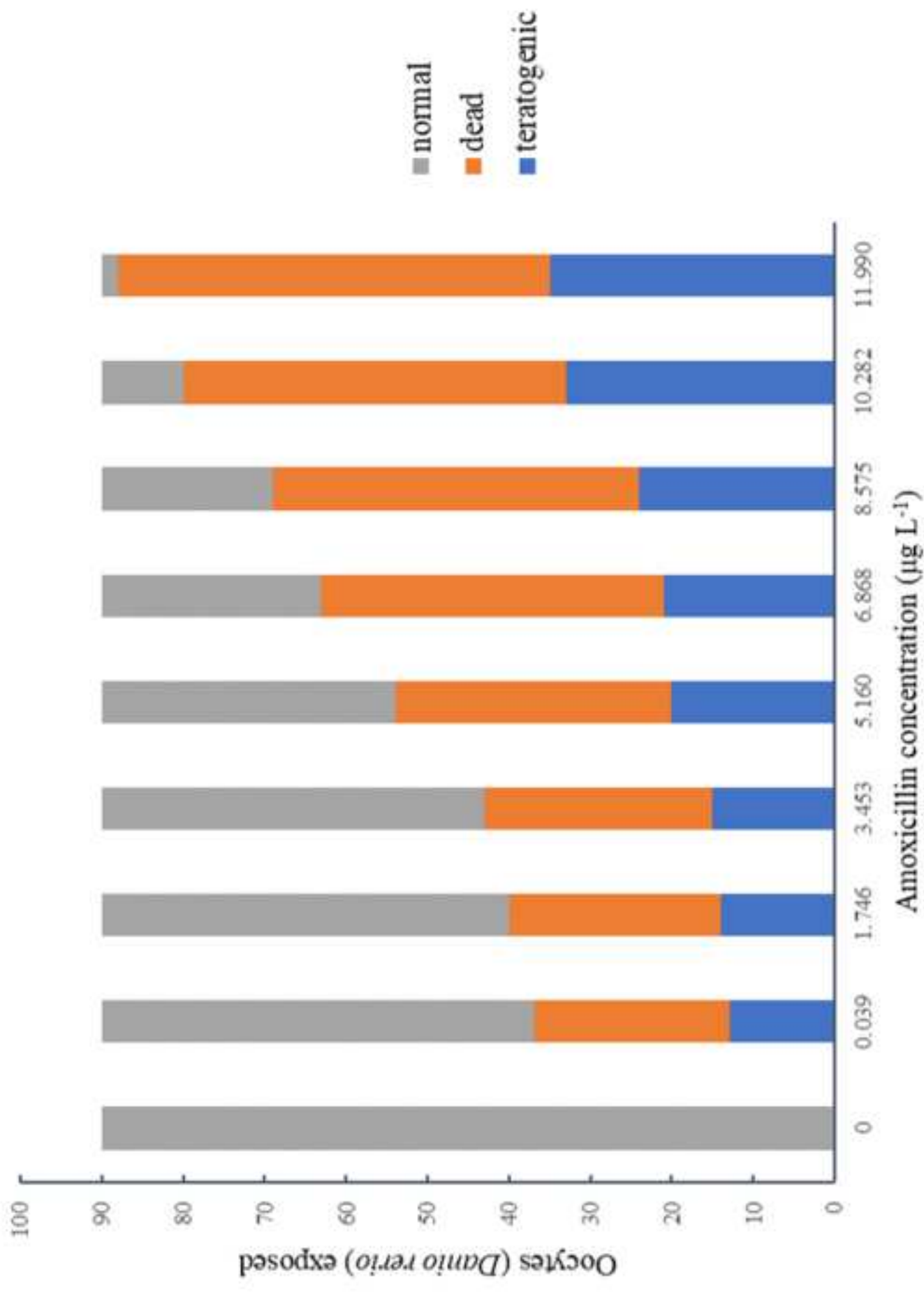
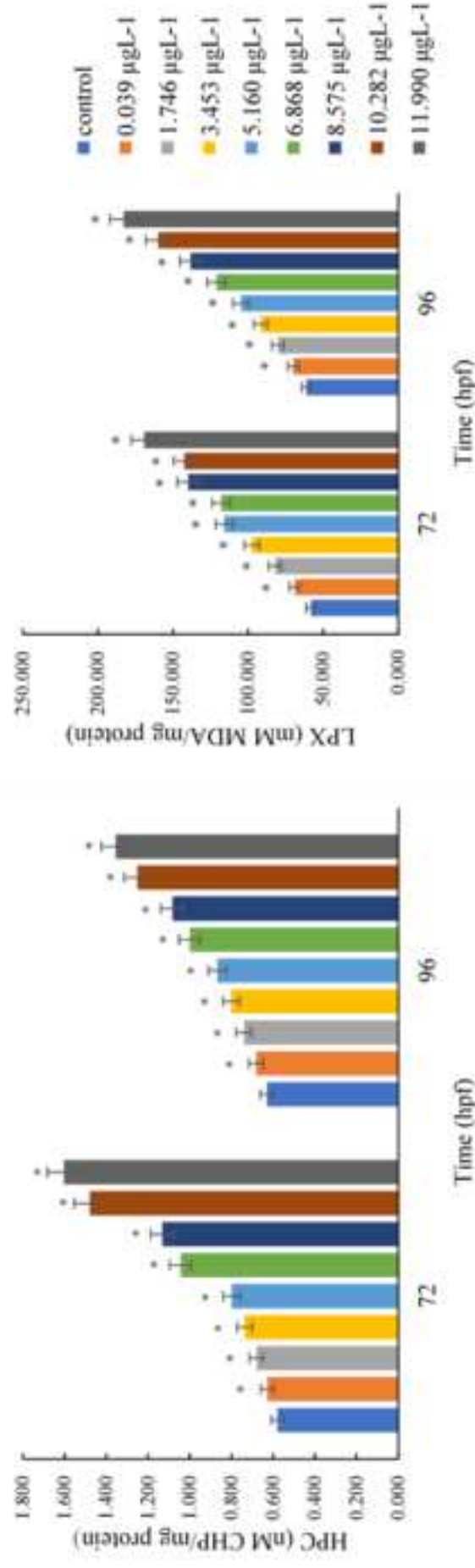
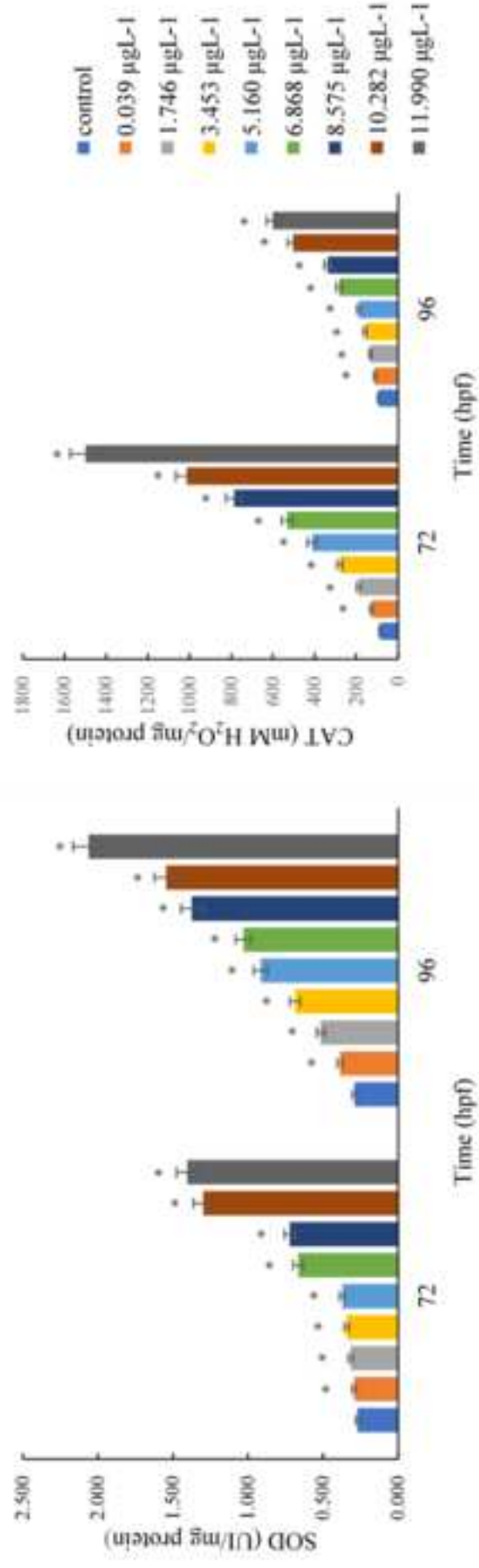


Figure 3



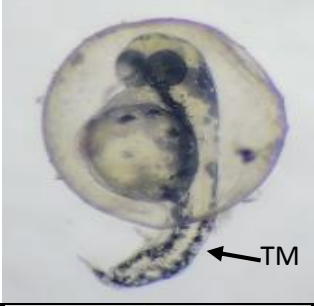
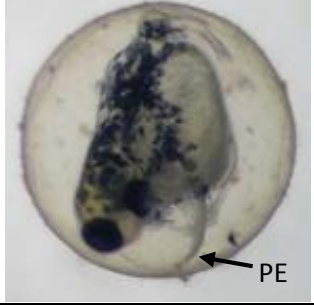

[Click here to access/download;colour figure;Figure 3.tiff](#)





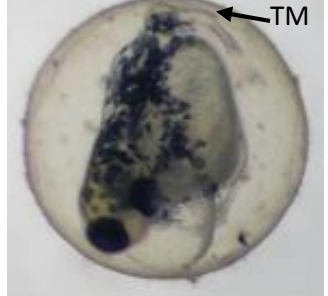







AMX concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Number of embryos exposed	Mortality (%)	Malformations (%)
0	90	0	0
0.039	90	26.7	28.9
1.746	90	28.9	35.6
3.453	90	31.1	47.8
5.160	90	37.8	55.6
6.868	90	46.7	60.0
8.575	90	50.0	68.9
10.282	90	52.2	77.8
11.990	90	58.9	81.1
		$\text{LC}_{50} = 14.192$	$\text{EC}_{50} = 7.083$
		$\text{CI} = [10.902-28.897]$	$\text{CI} = [5.051-8.658]$
		$\text{TI} = 2.003$	

AMX concentration	Malformations
0.039 μgL^{-1}	 <p data-bbox="1024 327 1154 359">YSM</p>
1.746 μgL^{-1}	 <p data-bbox="1102 806 1138 837">PE</p>
3.453 μgL^{-1}	 <p data-bbox="1102 1094 1138 1125">TM</p>
5.160 μgL^{-1}	 <p data-bbox="1102 1415 1138 1446">PE</p>
6.868 μgL^{-1}	 <p data-bbox="919 1482 943 1514">S</p> <p data-bbox="1146 1493 1203 1524">WPF</p>

<p>8.575 μgL^{-1}</p>	 <p>PE</p>	 <p>HR</p>
<p>10.282 μgL^{-1}</p>	 <p>WPF</p>	 <p>YSM</p>
<p>11.990 μgL^{-1}</p>	 <p>TM</p>	 <p>HR</p>

TM: tail malformation, **PE:** pericardial edema; **YSM:** yolk sac malformation; **S:** scoliosis; **WPF:** Whitouth pectoral fin ; **HR:** hatching retardation